



Biominéralisation intracellulaire par des cyanobactéries : du modèle aux cellules

Nithavong Cam

► To cite this version:

Nithavong Cam. Biominéralisation intracellulaire par des cyanobactéries : du modèle aux cellules. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066495>. <tel-01299797>

HAL Id: tel-01299797

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01299797>

Submitted on 8 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale Physique et Chimie des Matériaux 397

Laboratoire de Réactivité de Surface / Équipe Biointerfaces

Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et Cosmochimie / Équipe GéoBiologie

Biominéralisation intracellulaire par des cyanobactéries : du modèle aux cellules

Par Nithavong CAM

Thèse de doctorat de Physique et Chimie des Matériaux

Financée par le LabEx Matisse

Dirigée par Karim Benzerara et Jean-François Lambert

Présentée et soutenue publiquement le 13 novembre 2015

Devant un jury composé de :

Patrick Guenoun,	ingénieur CEA	Rapporteur
Oleg Pokrovsky,	directeur de recherche	Rapporteur
Alejandro Fernandez-Martinez,	chargé de recherche	Examineur
Purificación Lopez-Garcia,	directrice de recherche	Examinatrice
Thibaud Coradin,	directeur de recherche	Examineur
Karim Benzerara,	directeur de recherche	Directeur de thèse
Jean-François Lambert,	professeur	Directeur de thèse
Thomas Georgelin,	maître de conférences	Co-encadrant
Maguy Jaber,	professeur	Co-encadrant



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Karim Benzerara qui m'a aiguillé tout au long de ce projet. Merci pour sa confiance et sa disponibilité.

Un grand merci à Thomas Georgelin pour m'avoir aidé à me lancer dans cette thèse et pour sa grande implication tout au long de ces 3 années.

Je remercie aussi Jean-François Lambert, avec qui j'ai apprécié collaborer et pour ses commentaires enrichissants. Merci à Maguy Jaber pour sa bonne humeur et sa bienveillance.

Je remercie les membres du jury et particulièrement Oleg Pokrovsky et Patrick Guenoun d'avoir voulu jugé ce travail.

Un merci chaleureux à Fériel Skouri-Panet qui trouve toujours une solution, merci pour sa bonne humeur et sa disponibilité. Je remercie aussi Mélanie Poinot pour son efficacité et sa motivation inébranlable.

Pour leur aide en diffraction des rayons x, merci à Guillaume Morin, Ludovic Delbes et particulièrement à Benoît Baptise pour l'analyse des structures locales. Merci à Nicolas Menguy et Jean-Michel Guignier pour leur aide et conseils indispensables en microscopie électronique en transmission. Je remercie également tous le personnel de l'IMPMC et du LRS, sans oublier l'administratif.

Merci à Sandra Casale et David Montero pour la microscopie électronique à balayage : merci pour leur participation et leur enseignement.

Merci au personnel de l'IPGP Laure Cordier et Emmanuelle Rimbault pour les analyses poussés des milieux de culture. Je suis ravi d'avoir pu collaborer avec Didier Jezequel, enthousiaste et un réel appui dans la réflexion.

Je tiens aussi à remercier l'équipe colloïde inorganique du laboratoire PHENIX et particulièrement Christine Ménager pour m'avoir accueilli en stage et au début de cette thèse.

Merci à l'ensemble de l'équipe GéoBiologie, les ex-stagiaires, (ex-)doc et (ex-)postdoc pour leur accueil et leurs aides. Courage aux futures doctresses Sara, Francesca et Nina. Bien entendu, un très grand merci aux doctorants du LRS et de l'IMPMC, spécialement à mes co-bureaux Nicolas Dupuy, Vincent Vercamer et Thibault Sohier (qui arroseront les plantes).

Aux amis du master Nanochimie Matériaux Surface, de plus en plus dispersés à travers le monde : c'est fait !

Enfin, merci à mes amis et à ma famille qui sont et seront toujours un soutien.

Merci à ma petite Fiona.

"It is interesting to contemplate an entangled bank, clothed with many plants of many kinds, with birds singing on the bushes, with various insects flitting about, and with worms crawling through the damp earth, and to reflect that these elaborately constructed forms, so different from each other, and dependent on each other in so complex a manner, have all been produced by laws acting around us. These laws, taken in the largest sense, being Growth with Reproduction; Inheritance which is almost implied by reproduction; Variability from the indirect and direct action of the external conditions of life, and from use and disuse; a Ratio of Increase so high as to lead to a Struggle for Life, and as a consequence to Natural Selection, entailing Divergence of Character and the Extinction of less-improved forms. Thus, from the war of nature, from famine and death, the most exalted object which we are capable of conceiving, namely, the production of the higher animals, directly follows. There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved."

Charles Darwin. (1859) "On the Origin of Species". First Edition *London John Murray*

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	11
1. LES CYANOBACTERIES ET LA BIOMINERALISATION.....	11
1.1. Généralités sur les cyanobactéries.....	11
1.2. La précipitation extracellulaire de carbonate de calcium par les cyanobactéries.....	11
1.3. La précipitation intracellulaire de carbonate de calcium par les cyanobactéries.....	13
2. LE CARBONATE DE CALCIUM AMORPHE.....	15
3. LES ENJEUX ET LES PROBLEMATIQUES.....	16
3.1. Quelles sont les implications de la formation de CaCO_3 dans les cyanobactéries ?.....	16
3.2. Quel est l'impact de l'accumulation du strontium et du baryum dans ces carbonates de calcium ?.....	16
4. UNE METHODOLOGIE DE TRAVAIL PAR DOUBLE APPROCHE.....	17
MATERIEL ET METHODES.....	19
1. LA CULTURE DE CYANOBACTERIES.....	19
1.1. Les souches étudiées.....	19
1.2. Relation entre densité optique (DO) des cultures, nombre et masse des cellules.....	20
1.3. Les conditions de culture.....	21
1.4. Protocole de suivi de la croissance et de la composition chimique des cultures de cyanobactéries.....	23
2. METHODES DE CARACTERISATION.....	24
2.1. Analyses de la chimie du milieu extracellulaire.....	24
2.1.1. Mesure de la concentration en calcium par colorimétrie (Moorehead WR & Biggs HG, 1974):.....	24
2.1.2. Mesure des concentrations en cations par ICP-AES.....	25
2.1.3. Dosage de P et N.....	26
2.1.4. Mesure des concentrations en anions par chromatographie ionique.....	27
2.1.5. Mesure de l'alcalinité et détermination du carbone inorganique soluble.....	27
2.1.6. Calculs de saturation par le logiciel de spéciation chimique Visual MINTEQ ver. 3.0.....	28
2.2. Analyse par diffraction des rayons x de cyanobactéries en fonction de la température (25-900 °C).....	29
2.3. Microscopie électronique en transmission.....	29
2.4. Mesures de spectre XANES de carbonates et de cyanobactéries.....	30
CHAPITRE 1 : SYNTHESE IN VITRO DE CARBONATES DE CALCIUM EN CONDITIONS ABIOTIQUES	31
1. INTRODUCTION.....	31
2. IN VITRO SYNTHESIS OF AMORPHOUS MG-, CA-, SR- AND BA-CARBONATES: WHAT DO WE LEARN ABOUT INTRACELLULAR CALCIFICATION BY CYANOBACTERIA? ARTICLE PUBLIÉ DANS GEOCHIMICA ET COSMOCHIMICA ACTA.....	32
3. ÉTUDES COMPLEMENTAIRES NON INCLUES DANS L'ARTICLE.....	69
3.1. Évolution thermique de la cristallinité des particules synthétisées par les cyanobactéries.....	69
4. CONCLUSION.....	75
5. PERSPECTIVES.....	77
5.1. Détermination des limites de stabilité des carbonates amorphes.....	77
5.2. Analyses thermogravimétriques sur des culots cellulaires.....	77
5.3. Analyses de Pair Distribution Function (PDF) des carbonates amorphes synthétiques abiotiques.....	78
CHAPITRE 2 : ÉTUDE CINETIQUE DE LA PRECIPITATION DE CARBONATES DE CALCIUM INTRACELLULAIRES PAR DES CYANOBACTERIES.....	83
1. INTRODUCTION.....	83
2. RESULTATS.....	85
2.1. Cinétique d'incorporation du calcium par la souche <i>Gloeomargarita lithophora</i> C7.....	85
2.1.1. Étude des données macroscopiques des cultures.....	85
2.1.2. Étude microscopique des carbonates intracellulaires.....	108

2.2.	Incorporation du calcium par la souche <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.....	116
2.2.1.	Étude des données macroscopiques des cultures.....	116
2.2.2.	Étude microscopique des carbonates intracellulaires.....	128
2.3.	Incorporation du calcium par la souche <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1.....	133
2.3.1.	Étude des données macroscopiques des cultures.....	133
2.3.2.	Étude microscopique des carbonates intracellulaires.....	141
2.4.	Suivi de culture de cyanobactéries ne formant pas de carbonates intracellulaires : PCC 7942 et PCC 73106.....	145
2.4.1.	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942.....	145
2.4.2.	<i>Gloeocapsa</i> sp. PCC 73106.....	157
2.5.	Effet des modifications de l'environnement sur l'incorporation du calcium.....	160
2.5.1.	Effet de l'ajout de calcium sur la croissance cellulaire de <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1.....	160
2.5.2.	Effet de l'ajout de calcium sur la formation de carbonates intracellulaires.....	165
2.5.3.	Effet de l'absence de lumière sur l'incorporation de calcium.....	170
2.5.4.	Effet de la diminution du pH dans le milieu sur le relargage du calcium.....	171
3.	DISCUSSION.....	173
3.1.	Le calcium de la solution se retrouve principalement dans les carbonates intracellulaires.....	174
3.2.	La formation de carbonates intracellulaires est un processus actif.....	177
3.3.	Quels sont les paramètres qui régissent l'incorporation du calcium ?.....	179
3.3.1.	La concentration en calcium.....	180
3.3.2.	La lumière.....	180
3.3.3.	Le pH.....	181
3.4.	Les avantages évolutifs de la formation de carbonates de calcium intracellulaires.....	182
3.4.1.	La diminution de l'alcalinité exportée.....	182
3.4.2.	Le stockage de calcium et de carbone.....	183
3.5.	La diversité dans les cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires.....	184
4.	CONCLUSION.....	187
5.	PERSPECTIVES.....	187
5.1.	L'effet de la lumière.....	187
5.2.	Les différences de mécanismes avec les cyanobactéries ne formant pas de carbonates intracellulaires.....	188
5.3.	La composition du milieu intracellulaire.....	188
5.4.	Identification et rôles des différents réservoirs.....	189

CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE L'INCORPORATION DE STRONTIUM (SR) ET DE BARYUM (BA) DANS LES CYANOBACTERIES FORMANT DES CARBONATES INTRACELLULAIRES 191

1.	INTRODUCTION.....	191
2.	RESULTATS.....	195
2.1.	Incorporation du strontium et du baryum par la souche <i>Gloeomargarita lithophora</i> C7.....	195
2.1.1.	Culture de <i>G. lithophora</i> C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 μ M de strontium et de baryum sous lumière continue à 30 °C.....	195
2.1.2.	Effet de concentrations plus élevées de strontium et de baryum : culture de <i>G. lithophora</i> C7 dans le milieu BG-11 contenant 245 μ M de strontium et de baryum sous lumière continue à 30 °C.....	213
2.1.3.	Effet de la température : culture de <i>G. lithophora</i> C7 dans le milieu BG-11 contenant du strontium et du baryum sous lumière continue à 25 °C.....	217
2.1.4.	Effet de l'absence de lumière : culture de <i>G. lithophora</i> C7 dans un milieu contenant du strontium et du baryum à l'obscurité.....	219
2.2.	Incorporation du strontium et du baryum par la souche <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.....	223
2.3.	Incorporation du strontium et du baryum par les souches <i>Synechococcus caldipolaris</i> G9 et <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312.....	229
2.4.	effet relatif du strontium et du baryum sur la croissance d'une culture de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.....	236
3.	DISCUSSION.....	239
3.1.	Implications de l'accumulation de strontium et de baryum.....	239
3.1.1.	La dépollution d'environnements contaminés par des déchets radioactifs comme le ^{90}Sr	239
3.1.2.	L'effet de grandes concentrations intracellulaires en strontium et en baryum sur la physiologie.....	242
3.2.	Mécanisme d'accumulation du strontium et du baryum et sélectivité vis-à-vis du calcium.....	244
3.2.1.	Hypothèse 1 : L'entrée des éléments dans le cytoplasme.....	245
3.2.2.	Hypothèse 2 : La sortie de ces éléments vers le milieu extracellulaire.....	246
3.2.3.	Hypothèse 3 : Une membrane vésiculaire sélective autour des carbonates.....	247
3.2.4.	Hypothèse 4 : Un réservoir transitoire sélectif.....	248

3.2.5.	<i>Hypothèse 5 : Un piège intracellulaire sélectif</i>	248
4.	CONCLUSION	251
5.	PERSPECTIVES	251
5.1.	<i>Le rôle de la photosynthèse</i>	251
5.2.	<i>L'étendue du phénotype d'accumulation sélective du strontium et du baryum</i>	252
5.3.	<i>Les capacités de dépollution de <i>Gloeomargarita lithophora</i></i>	252
CONCLUSION GENERALE		253
BIBLIOGRAPHIE		255
ANNEXE 1 - SUIVI DU MILIEU DE CULTURE SEUL		265
ANNEXE 2 - INCORPORATION DU CALCIUM PAR LA SOUCHE <i>SYNECHOCOCCUS</i> SP. PCC 6312		266

Introduction générale

Le mot *biominéralisation* a été défini par Lowenstam en 1981 : C'est l'ensemble des procédés et mécanismes par lesquels un organisme vivant forme un solide inorganique. La biominéralisation est dite induite quand un organisme produit des minéraux sans avoir de gène codant des protéines dédiées à cette formation. Dans ce cas, le résultat de l'activité métabolique de l'organisme génère les conditions propices à la précipitation. A contrario, la biominéralisation dite contrôlée regroupe les mécanismes associés à la formation de minéraux ayant une fonction précise pour l'organisme comme la structure (squelette) ou la défense (coquille). Ce type de biominéralisation implique des gènes et des protéines spécifiques et souvent des matrices organiques qui orientent les cristaux formés.

Sur la Terre actuelle, la plus grosse activité de biominéralisation est fournie par des foraminifères, protozoaires unicellulaires formant des tests et les coccolithophoridés, algues unicellulaires formant des plaques de calcite nommées coccolithes. Avec les frustules siliceux des diatomées, ces biominéraux constituent une grande partie des sédiments marins actuels (Bramlette, 1958).

1. Les cyanobactéries et la biominéralisation

1.1. Généralités sur les cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des bactéries à coloration Gram-négative, réalisant la photosynthèse oxygénique. Elles utilisent l'énergie lumineuse pour réduire du carbone inorganique (CO_2) en carbone organique et oxyder de l'eau en dioxygène. On en retrouve des traces fossiles abondantes dans le registre géologique, possiblement depuis plus de deux milliards d'années (Schopf, 2000). Elles sont considérées comme étant à l'origine par endosymbiose des chloroplastes (Delwiche and Palmer, 1997), organites présents dans les cellules photosynthétiques des végétaux et des algues unicellulaires dans lesquelles a lieu la photosynthèse. Elles sont présentes sur toute la surface de la Terre actuelle (Badger et al., 2006; Whitton, 2012) et 25 % de la photosynthèse moderne globale pourraient être dus à deux genres de cyanobactéries marines (Fuhrman, 2003).

1.2. La précipitation extracellulaire de carbonate de calcium par les cyanobactéries

La principale activité de biominéralisation par les cyanobactéries a lieu à la surface de ces cellules et peut conduire à leur emprisonnement. Ainsi se sont formés de nombreux fossiles (Klein et al., 1987; Schopf et al., 2007). De nombreuses cyanobactéries sont

capables d'induire la précipitation de carbonate de calcium (Lee et al., 2004; Lee et al., 2006; Jansson and Northen, 2010; Bundelewa et al., 2014; Han et al., 2014). Les cyanobactéries ont ainsi contribué à la formation de roches comme les stromatolithes (Bosak et al., 2012).

Les facteurs importants dans la précipitation des carbonates de calcium sont la concentration en calcium, la concentration en carbone inorganique dissous, le pH et les sites de nucléations (Hammes and Verstraete, 2002).

Les cyanobactéries ont des mécanismes pour concentrer le carbone inorganique (CCM pour « CO₂ concentrating mechanisms ») dans leur milieu intracellulaire afin d'augmenter l'efficacité de la RuBisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase), enzyme clef de la photosynthèse, et plus précisément d'augmenter relativement son activité carboxylase vs. oxydase grâce à une activité élevée en CO₂ (Miller and Colman, 1980; Badger et al., 1985; Price et al., 2002). Ce système de concentration entraîne un relargage d'OH⁻ dans le milieu extracellulaire et augmente donc l'alcalinité (Badger and Price, 2003; Ridinger, 2006). Les cyanobactéries peuvent ainsi induire l'augmentation du pH de leur milieu.

De plus, des protéines situées dans la membrane transportent de manière concomitante le calcium vers le milieu extérieur. Waditee et al. (2004) ont montré l'existence d'un transporteur chez une cyanobactérie qui régule à une teneur très basse la concentration cytoplasmique de calcium en exportant les ions calcium et en important des protons (ce qui a le même effet que d'exporter des OH⁻). Jiang et al. (2013) ont montré que l'inactivation de ce type de transporteur active les gènes responsables de l'importation du HCO₃⁻ dans les cyanobactéries.

L'activité du CCM entraîne une augmentation du pH autour de la cellule. La sursaturation pour les phases de carbonates de calcium de son milieu extracellulaire augmente alors et la précipitation peut se produire notamment à la surface des cyanobactéries (Jansson and Northen, 2010). Le schéma du système de concentration du carbone est représenté dans la Figure I.1. Comme on le voit, la situation ne se limite pas à la présence d'un milieu interne et d'un milieu externe, mais se complique par la présence d'un espace intermembranaire et du milieu interne aux organites.

Les cyanobactéries participent donc activement à la fixation du carbone par leur activité photosynthétique (Partensky et al., 1999) et par leur activité de biominéralisation extracellulaire induite (Kamennaya et al., 2012).

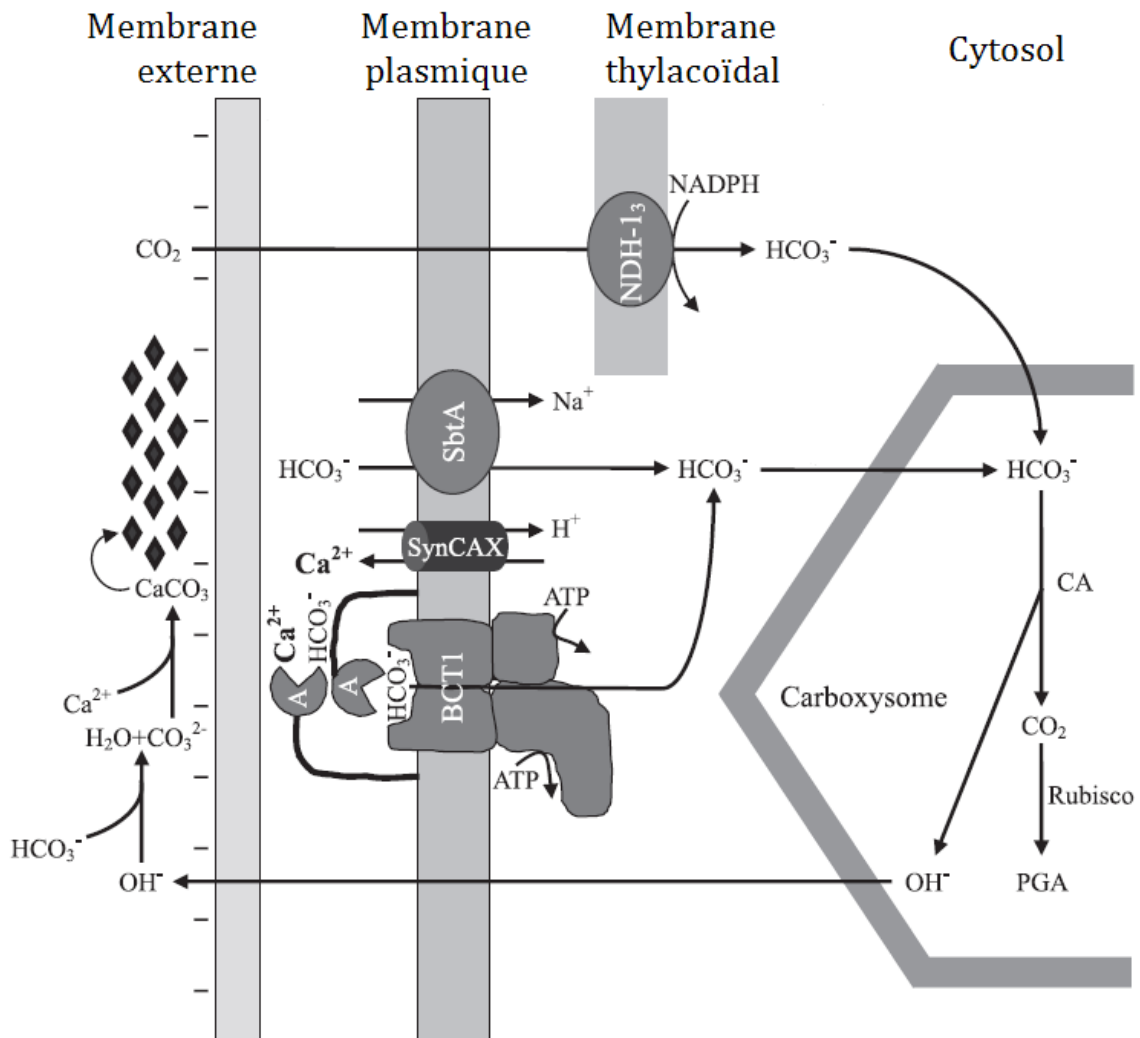


Figure I.1 : Schéma tiré de Jiang et al. (2013) représentant le système de concentration du carbone dans une cyanobactérie, l'exportation de Ca^{2+} (Waditee et al., 2004) et la précipitation de carbonate de calcium extracellulaire.

1.3. La précipitation intracellulaire de carbonate de calcium par les cyanobactéries

Depuis des décennies, l'activité de biominéralisation des cyanobactéries était considérée comme uniquement extracellulaire et induite par leur système de concentration du carbone dont la fonction est d'augmenter l'activité photosynthétique. Il y a quelques années, (Couradeau et al., 2012) ont décrit pour la première fois des carbonates de calcium présents dans le milieu intracellulaire d'une espèce de cyanobactérie nommée *Gloeomargarita lithophora* (Figure I.2). Cette espèce, ainsi que *Synechococcus calcipolaris*, formant également des carbonates intracellulaires, ont été isolées de microbialites carbonatés provenant du lac Alchichica au Mexique préalablement incubés dans des aquariums au laboratoire. Ce milieu où ces cyanobactéries ont été

détectées est plutôt alcalin ($[\text{HCO}_3^-] = 13,617 \text{ mM}$) à un pH de 8,9 et contient $47 \mu\text{M}$ de calcium. Le milieu est saturé pour les carbonates de calcium et de magnésium. Ces cyanobactéries ont par la suite été retrouvées dans de nombreux autres environnements à travers le monde, notamment grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques permettant d'amplifier leur ADN 16S (Ragon et al., 2014).

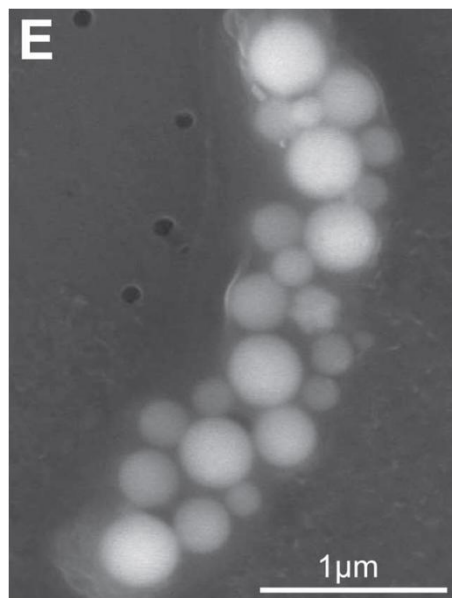


Figure I.2 : Cyanobactérie *Gloeomargarita lithophora* formant des carbonates intracellulaires. Image MEB tirée de (Couradeau et al., 2012).

De plus, d'autres espèces de cyanobactéries, isolées de différents endroits dans le monde, formant des carbonates de calcium intracellulaires ont par la suite été mises en évidence par une étude systématique de souches de la collection de cyanobactéries de l'institut Pasteur couvrant une grande diversité phylogénétique (Benzerara et al., 2014). Certaines sont très proches phylogénétiquement mais d'autres semblent éloignées. Deux phénotypes ressortent des observations faites sur toutes ces espèces : les carbonates formés sont soit localisés au niveau des pôles et au niveau du septum des cellules pour des espèces regroupées dans un phylum unique, celui de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Ou alors, les carbonates sont dispersés dans toute la cellule pour d'autres espèces qui, elles, en revanche, apparaissent à différents endroits de l'arbre phylogénétique des cyanobactéries. Les carbonates intracellulaires contenus dans ces bactéries sont amorphes d'après l'analyse en diffraction des électrons (Figure I.3). Au moins pour l'une des espèces, les carbonates peuvent contenir de grandes quantités de strontium et de baryum par rapport au calcium (Couradeau et al., 2012), ces éléments étant très concentrés par rapport au milieu extracellulaire.

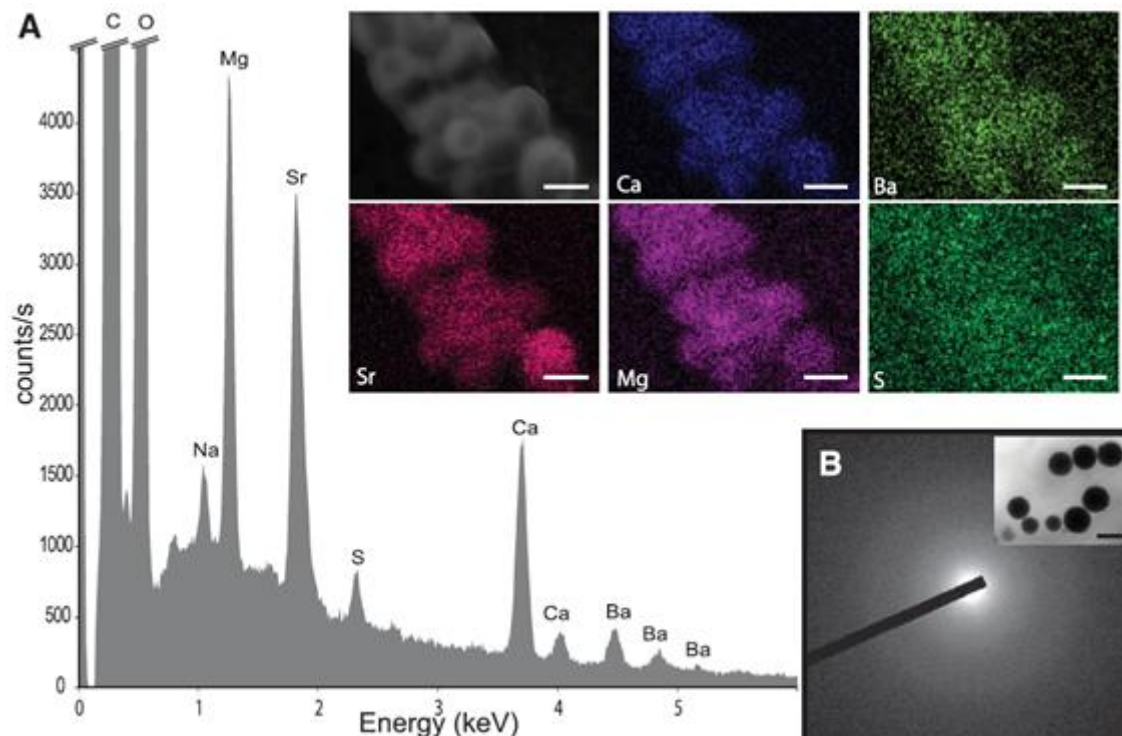


Figure I.3 : Caractérisation chimique et minéralogique d'inclusions intracellulaires de *G. lithophora*. (A) Spectre EDXS-MEB et les cartes chimiques associées (barre d'échelle, 300 nm). Seuls le Ca, Mg, Sr et Ba sont spécifiquement associés aux inclusions. (B) Diffraction électronique d'inclusions de carbonates (barre d'échelle, 300 nm). (Couradeau et al., 2012).

2. Le carbonate de calcium amorphe

Les phases de carbonate de calcium les plus abondantes à la surface de la Terre sont la calcite et l'aragonite. Les amorphes de carbonate de calcium peuvent cependant être présents dans des structures d'origine biogénique notamment (Addadi et al., 2003). Il a été proposé que ces phases amorphes sont utilisées par les organismes comme des précurseurs de carbonates cristallins (Politi et al., 2008). Ce contrôle de la biominéralisation des carbonates est principalement vu chez les eucaryotes, alors qu'elle est souvent considérée comme un phénomène induit chez les bactéries.

Les carbonates de calcium amorphes ont une solubilité plus grande que les phases cristallines de carbonates de calcium (produit de solubilité = $2,32 \pm 0,41 \cdot 10^{-8} \text{ M}^2$ à pH 9, Kellermeier et al., 2014) et sont donc moins stables (Radha et al., 2012). L'amorphe de carbonate de calcium (appelé ACC) peut néanmoins être stabilisé par des ions magnésium, des molécules organiques (Aizenberg et al., 1996; Bentov et al., 2010) ou bien par l'effet du confinement (Stephens et al., 2010) notamment dans des vésicules (Nudelman et al., 2010). Ces trois mécanismes sont envisageables dans le cas des cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires.

3. Les enjeux et les problématiques

3.1. Quelles sont les implications de la formation de CaCO_3 dans les cyanobactéries ?

Les carbonates de calcium amorphes sont peu stables, néanmoins des molécules ou des contraintes (Nudelman et al., 2010) peuvent stabiliser cette phase. Dans le cas des cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires, la stabilisation de la phase amorphe par des biomolécules ou par l'effet du confinement est envisageable. Néanmoins, pour qu'il y ait formation de carbonate de calcium amorphe, il faut nécessairement que le milieu soit concentré en calcium et en carbone inorganique.

La phase amorphe de carbonate de calcium est une phase labile qui peut être utilisée par les organismes eucaryotes comme un précurseur de carbonate cristallin par un processus de recristallisation à l'état solide. Aucun précipité cristallin formé par les cyanobactéries contenant des carbonates amorphes n'a été mis en évidence. Ce matériau semble donc être particulièrement stabilisé dans les cellules, ce qui signifie qu'il pourrait avoir une autre utilité (s'il en a une) pour ces organismes procaryotes que la simple facilité de "mise en forme". Cette labilité pourrait-elle permettre de stocker du calcium et/ou du carbone pour être remobilisé ?

La découverte de carbonates de calcium intracellulaires souligne les limites actuelles de notre compréhension des mécanismes de bio-minéralisation par des cyanobactéries. La formation de carbonates intracellulaires implique qu'une partie de l'alcalinité produite lors de la concentration du CO_2 dans la cellule n'est pas exportée mais prise dans les carbonates. Ces carbonates peuvent-ils tamponner le milieu intracellulaire et augmenter l'efficacité du CCM ? Une bio-minéralisation intracellulaire pose aussi la question du contrôle de ce phénomène par la cellule, donc de savoir s'il y a dans son génome des gènes codant spécifiquement pour des protéines spécifiques impliquées dans la formation des inclusions.

3.2. Quel est l'impact de l'accumulation du strontium et du baryum dans ces carbonates de calcium ?

La concentration du strontium et du baryum est un phénomène rare dans le monde du vivant. Ces éléments peuvent être concentrés dans des micro-algues (Krejci, Wasserman, et al., 2011) et certains coccolithophoridés peuvent générer des calcites avec une incorporation de strontium et baryum plus grande que la calcite abiotique (Langer et al., 2006; Langer et al., 2009).

Le rapport atomique Sr/Ca dans les carbonates de calcium (calcite et aragonite) dépend de la température (Rimstidt et al., 1998; Dietzel et al., 2004). Ce rapport est très étudié, il permet de déterminer la température de l'eau de mer au moment de la

précipitation et sert ainsi de proxy pour les paléoenvironnements (Kunioka et al., 2006; Meibom et al., 2008). Dans le cas des carbonates intracellulaires des cyanobactéries, nous sommes en présence d'un procédé biologique qui modifie ce rapport (Couradeau et al., 2012). Il est donc nécessaire de connaître l'ampleur de ce phénomène. Toutes les espèces de cyanobactéries contenant des carbonates intracellulaires peuvent-elles concentrer du strontium et du baryum par rapport au calcium ? Cet enrichissement est-il inhérent à la formation des carbonates ?

Les biominéraux peuvent être une trace mieux préservée dans l'enregistrement géologique que les organismes qui les forment. Des carbonates amorphes riches en strontium et en baryum par rapport au calcium pourraient peut-être permettre de mettre en évidence des fossiles de ces cyanobactéries. Cela suggère une autre question: Dans quelles conditions ces carbonates amorphes peuvent-ils se conserver ?

4. Une méthodologie de travail par double approche

Pour comprendre le phénomène nous avons décidé de l'aborder de deux façons complémentaires :

Une approche *in vitro* pour reproduire des inclusions aux caractéristiques similaires et comprendre l'environnement et les conditions de formation des carbonates intracellulaires. Les difficultés sont principalement dans la stabilité de l'amorphe. Est-il possible de reproduire des carbonates similaires sans utiliser de molécules organiques capables de stabiliser et structurer la phase amorphe de carbonate de calcium ? De plus les cyanobactéries produisent les carbonates à température ambiante et certaines espèces qui en forment ont été isolées de sources chaudes. Il faut donc travailler à des températures proches de l'ambiante.

Également l'enrichissement du strontium et du baryum dans la phase amorphe de carbonate de calcium sera testé. L'enrichissement de ces deux éléments par rapport au calcium peut-il être reproduit par la précipitation abiotique ?

Une approche *in vivo* dans laquelle sera mesuré l'impact de ces cellules sur leur environnement et l'impact de l'environnement sur ces cellules (sur les inclusions formées). Cette approche permet de se rendre compte des conditions de formation des précipités intracellulaires. Y a-t-il des concentrations ou un pH minimal du milieu extracellulaire ? Si les cyanobactéries forment des carbonates intracellulaires dans un milieu de culture sous-saturé alors il y a un procédé actif qui permet de saturer l'intérieur des cellules.

Les cyanobactéries sont nombreuses et présentes dans beaucoup d'environnements différents (Whitton, 2012). On sait que l'activité des cyanobactéries peut modifier le milieu dans lequel elles vivent. Les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires modifient-elles de la même façon leur environnement ?

Matériel et Méthodes

La compréhension de la précipitation intracellulaire de carbonate de calcium dans les cyanobactéries est abordée de deux façons complémentaires. Ce sujet interdisciplinaire nécessite d'utiliser des approches variées comme des synthèses chimiques de phases solides, des approches de microbiologie, des techniques analytiques comme la diffraction des rayons x, la microscopie électronique, l'analyse thermogravimétrique et la spectroscopie d'absorption x. Également des calculs de spéciation chimique ont permis d'interpréter les données. Les techniques et préparations spécifiques ou qui nécessitent des précisions pour la compréhension de la suite de la thèse seront détaillées ici.

La partie synthèse abiotique a fait l'objet d'une publication, les détails se trouvent donc exposés dans la partie Matériel et Méthodes de l'article dans le chapitre 1.

1. La culture de cyanobactéries

1.1. Les souches étudiées

Au cours de ce travail, nous avons été amenés à cultiver et analyser 7 souches différentes. Elles sont toutes unicellulaires, appartenant au même groupe comme défini par Rippka et al. (1979). Les souches de la collection Pasteur sont axéniques, c'est-à-dire pures. C7 et G9 sont des cultures ne comprenant qu'une espèce de cyanobactérie mais avec la présence systématique d'une alpha-protéobactérie dont l'abondance reste limitée le plus souvent. Le Tableau M&M.1 résume certaines caractéristiques de ces souches.

Tableau M&M.1 : Souches de cyanobactéries cultivées.

nom	largeur (μm)	inclusions de carbonates	Température de culture	provenance	référence(s)
<i>Gloeomargarita lithophora</i> C7	1	dispersé	30 °C	lac Alchichica, Mexique	Couradeau et al., 2012
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	3	dispersé	30 °C	rizière, Sénégal	Rippka et al., 1979
<i>Synechococcus calcipolaris</i> G9	1	aux pôles	22-30 °C	lac Alchichica, Mexique	Benzerara et al., 2014
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	1	aux pôles	45 °C	source chaude, Japon	Nakamura et al., 2002
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	1,3-1,5	aux pôles	30 °C	eau douce, Californie,	Stanier et al., 1971; Rippka et al., 1979
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	1-1,2	non	30 °C	eau douce, Californie,	Grigorieva & Shestakov, 1976; Shestakov & Reaston, 1987
<i>Gloeocapsa</i> sp. PCC 73106	6-7	non	30 °C	tourbière, Suisse	Rippka et al., 1979

1.2. Relation entre densité optique (DO) des cultures, nombre et masse des cellules

Les relations entre ces différents paramètres ont été établies par Mélanie Poinso, ingénieur d'étude en microbiologie (IMPMC). Pour déterminer la densité de cellules dans une suspension (nombre de cellules/mL), nous avons utilisé des cellules de Malassez (Malassez, 1873). Ce montage permet de déposer un volume connu de suspension sur une lame de verre avec un quadrillage visible au microscope optique. Il suffit de compter le nombre de cellules présent sur le quadrillage pour déterminer la densité de cellules. Nous avons utilisé la microscopie à épifluorescence pour une meilleure détection des cyanobactéries. Il s'agit d'exciter la fluorescence naturelle des cellules (notamment de la chlorophylle et de la phycocyanine) en les illuminant avec une lumière orange (longueur d'onde d'excitation : 590-650 nm) sous le microscope optique. Une image est obtenue en recueillant les photons émis par fluorescence dans le rouge (longue d'onde d'émission : 650-662 nm).

La densité optique (DO) des cultures ($-\log(I/I_0)$ où I et I_0 sont respectivement l'intensité transmise et l'incidente) a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Prim'Light SECOMAM en utilisant une longueur d'onde de 730 nm. Cette longueur d'onde permet de s'affranchir de l'absorption par la chlorophylle et la phycocyanine. La DO est ainsi reliée au nombre de cellules présentes dans la culture indépendamment de leur teneur relative en pigment. Des dilutions ont été effectuées systématiquement afin d'être dans une gamme de DO mesurée inférieure à 1,250 unité. DO et densité cellulaire ont été mesurées sur des cultures des différentes souches afin d'établir les relations entre ces deux grandeurs (cf. Tableau M&M.2).

Pour déterminer la relation entre la DO d'une culture et la quantité de matière sèche correspondante, environ 5 mL de cultures des différences souches dont la DO a été mesurée ont été concentrés 5 fois, rincés 3 fois dans 1 mL d'eau MilliQ puis lyophilisés. Le culot cellulaire sec a été pesé. En utilisant la relation entre DO et densité cellulaire, nous avons ainsi pu calculer la masse d'une cellule sèche. Les relations obtenues sont présentées dans le Tableau M&M.2.

Tableau M&M.2 : Relation entre la densité cellulaire et la DO à 730 nm, masse moyenne d'une cellule et temps de génération moyen aux températures respectives des différentes souches.

souche	densité cellulaire par unité de DO (mL^{-1})	masse d'une cellule sèche (g)	temps de génération moyen (h)
<i>Gloeomargarita lithophora</i> C7	1,49 (46) $\cdot 10^8$	4,08 $\cdot 10^{-12}$	102
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	4,16 (83) $\cdot 10^7$	7,90 $\cdot 10^{-12}$	50
<i>Synechococcus caldipolaris</i> G9	6,4 (1,1) $\cdot 10^7$	4,43 $\cdot 10^{-12}$	76
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	2,09 (58) $\cdot 10^7$	12,7 $\cdot 10^{-12}$	23
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	5,31 (54) $\cdot 10^7$	6,78 $\cdot 10^{-12}$	50
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	1,24 (35) $\cdot 10^8$	2,18 $\cdot 10^{-12}$	38

1.3. Les conditions de culture

Toutes les souches de cyanobactéries utilisées peuvent être cultivées dans le milieu BG-11 (Tableau M&M.3). Il s'agit d'un milieu minéral qui a été fréquemment utilisé pour la culture de cyanobactéries d'eau douce (Rippka et al., 1979). Le milieu est autoclavé à 120 °C pour le rendre stérile ; les carbonates sont ajoutés après pour obtenir un milieu dont le pH est compris entre 7,5 et 8. Les cultures ont été inoculées au 1/25^e ou au 1/50^e à partir de pré-cultures de cellules en phase exponentielle. Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 100 ou de 150 mL (remplis de 50-100 mL), et les pré-cultures utilisées pour l'inoculation ont été elles aussi cultivées dans du milieu BG-11. Les réplicats ont été préparés dans les mêmes récipients puis séparés entre plusieurs erlenmeyers. Les cultures ont été incubées à 30 °C à l'exception des cultures de *T. elongatus* BP-1 qui ont été incubées à 45 °C. La lumière dans les incubateurs a été allumée 24h/24 avec une luminosité variant entre 5 et 10 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ en fonction de l'emplacement. Les cultures placées à 30 °C sont agitées à 100 rpm. Au moins un erlenmeyer ne contenant que du milieu BG-11 a été placé dans chaque incubateur, comme témoin.

Tableau M&M.3 : Composition du BG-11. Les concentrations sont calculées à partir des quantités théoriques introduites et du pH mesuré (un pH similaire est obtenu avec le logiciel Visual MINTEQ).

Composé		Concentration (μM)	
NaNO ₃		17647	
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O		175,4	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		304,4	
CaCl ₂ ·2H ₂ O		244,9	
Acide citrique		28,57	
Citrates d'ammonium ferrique		30,00	
EDTA (dipotassium magnesium)		2,343	
NaHCO ₃		377,4	
B(OH) ₃		46,28	
MnCl ₂ ·4H ₂ O		9,151	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		0,7722	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		1,612	
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0,3164	
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O		0,1684	

Cations	Concentrations à pH 7,6 (μM)	Anions	Concentrations à pH 7,6 (μM)
Na ⁺	18024	Cl ⁻	508,1
K ⁺	355,6	NO ₃ ⁻	17647
Mg ²⁺	306,7	SO ₄ ²⁻	305,2
Ca ²⁺	244,9	HCO ₃ ⁻	376,7
Mn ²⁺	9,151	CO ₃ ²⁻	0,7177
Fe ³⁺	30,00	H ₂ PO ₄ ⁻	41,42
NH ₄ ⁺	29,34	HPO ₄ ²⁻	134,0
Zn ²⁺	0,7720	NH ₃	0,6569
Cu ²⁺	0,3160	H ₂ BO ₃ ⁻	1,297
Co ²⁺	0,1600	Citrate	58,57
		MoO ₄ ²⁻	1,612

Pour qu'une culture atteigne la même densité cellulaire que la pré-culture de laquelle elle est issue, il faut entre 2 et 4 semaines d'incubation. La microscopie optique par épifluorescence et la microscopie électronique en transmission permettent de mettre en évidence les éventuelles contaminations dans les cultures.

1.4. Protocole de suivi de la croissance et de la composition chimique des cultures de cyanobactéries

Dans le cadre des expériences sur l'incorporation du calcium d'une part et du strontium et du baryum d'autre part, des prélèvements des cultures ont été faits en moyenne tous les 24 h. Le protocole suivi a été le suivant (Figure M&M.1):

- Les erlenmeyers ont été pesés pour évaluer l'intensité de l'évaporation. Le volume d'eau perdu déduit a été remplacé avec de l'eau MilliQ (18,2 M Ω) stérilisée par autoclavage. Dans un erlenmeyer de 150 mL contenant 50 mL et incubé à 30 °C, il y a environ 0,5 mL d'évaporation par jour. Pour les erlenmeyers incubés à 45 °C, il y a environ 1,5 mL d'évaporation par jour.
- On a prélevé 500 μ L de chaque culture et du témoin non inoculé
- On a mesuré la DO à 730 nm. La densité optique du milieu seul a été mesurée par rapport à de l'eau MilliQ et celles des cultures de bactéries ont été mesurées par rapport au milieu seul. La précision de l'appareil est de 0,005.
- On a mesuré les pH des prélèvements systématiquement. La précision du pH-mètre est de 0,01. Néanmoins un suivi en continu (1 mesure toutes les 10 min) du milieu de culture seul sur 2 semaines a montré des variations pouvant aller jusqu'à 0,1 unité de pH en fonction du jour de la semaine et de l'heure (cf. annexe 1). Ces variations sont certainement dues aux variations de pCO₂ dans les salles d'expérience, notamment du fait de l'activité du personnel présent dans la pièce. Dans les cultures, les variations de pH inférieures ou égales à 0,1 unité ne sont donc pas significatives.
- Les 500 μ L ont été centrifugés à 4500 *g* pendant 10 min
- Les surnageants ont été filtrés à 0,22 μ m sur un filtre de 13 mm et acidifiés avec de l'acide nitrique (concentration finale entre 1 et 2 %).
- Les concentrations en calcium ont été mesurées par colorimétrie dont le principe est présenté dans la partie § 2.1.1 ou par ICP-AES (cf. § 2.1.2).

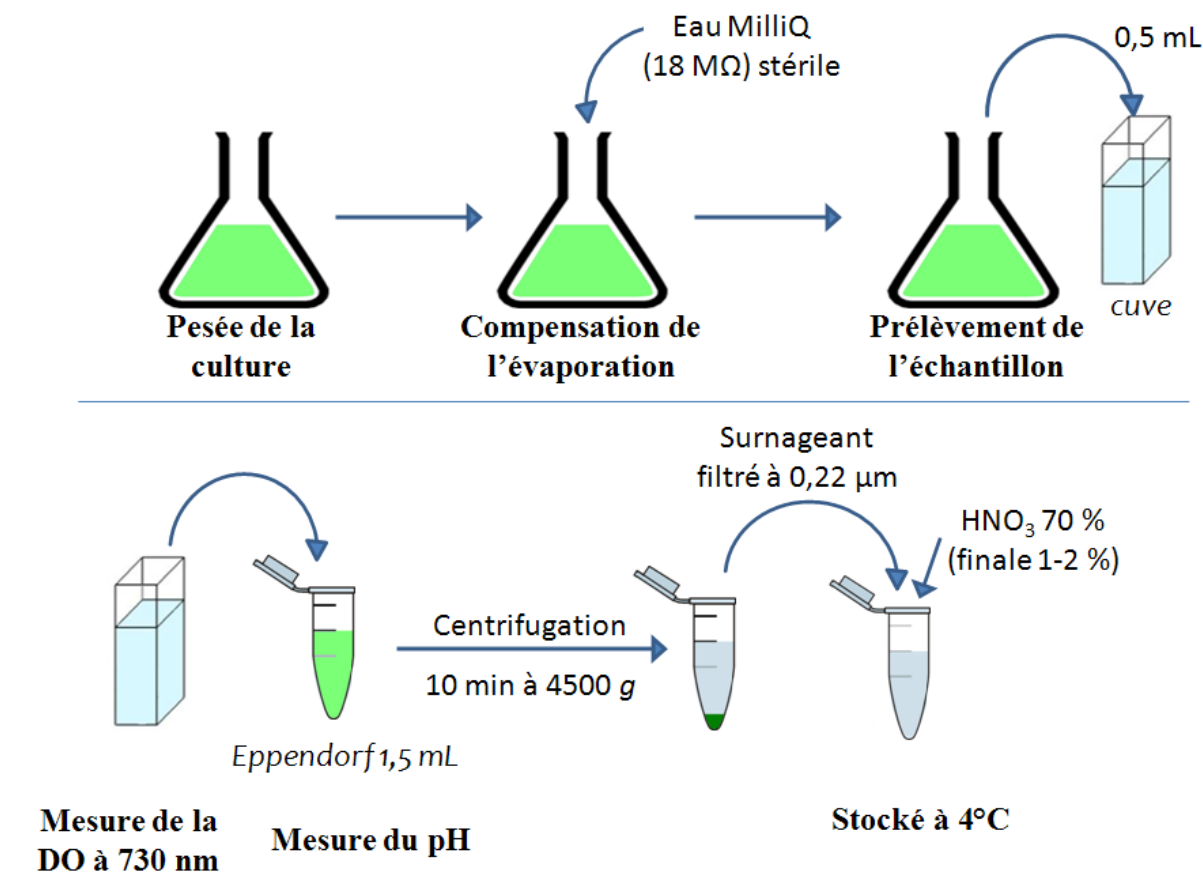


Figure M&M.1 : Schéma du suivi de culture de cyanobactéries.

Ces étapes du suivi des cultures de cyanobactéries nécessitent de sortir les cultures des incubateurs. La température de la pièce étant inférieure à celles des incubateurs, les cellules subissent un stress durant environ 30 min. Générer ce stress en température de façon trop fréquente (tous les jours) peut induire des variations dans la courbe de croissance.

2. Méthodes de caractérisation

2.1. Analyses de la chimie du milieu extracellulaire

2.1.1. Mesure de la concentration en calcium par colorimétrie

(Moorehead WR & Biggs HG, 1974):

Un mélange v/v est fait entre 1) une solution contenant 0,104 g/L d'o-crésolphtaléine complexone, 40 mM d'HCl et 1,5 g/L de 8-hydroxyquinoléine (réactif de coloration) et 2) une solution contenant 1 M de 2-amino,2-méthyl-1-propanol (réactif alcalin). 25 µL de filtrat acidifié est ajouté à 1 mL de ce mélange (Figure M&M.5). La DO à 570 nm de la solution est corrélée linéairement avec sa concentration en Ca^{2+} dans une gamme de 0 à 4000 µM. Une gamme étalon est faite avec des concentrations de 1000 µM,

500 μM , 250 μM , 125 μM , 100 μM et 50 μM . La limite de quantification de la technique est déterminée par la limite de détection du spectromètre. Celle-ci est de 0,005 unités, ce qui correspond à environ 20 μM en concentration de calcium dans l'échantillon mesuré. L'incertitude sur la mesure dépend, elle, de la précision du spectromètre (0,005 unités) et surtout de la précision sur la gamme étalon. Cette dernière est définie comme la moyenne des écarts aux valeurs théoriques calculés pour chaque étalon. Il est à noter de plus qu'il y a une dérive au niveau du spectromètre due à l'évolution de la coloration qui peut atteindre 0,015 sur des temps de 10 min.

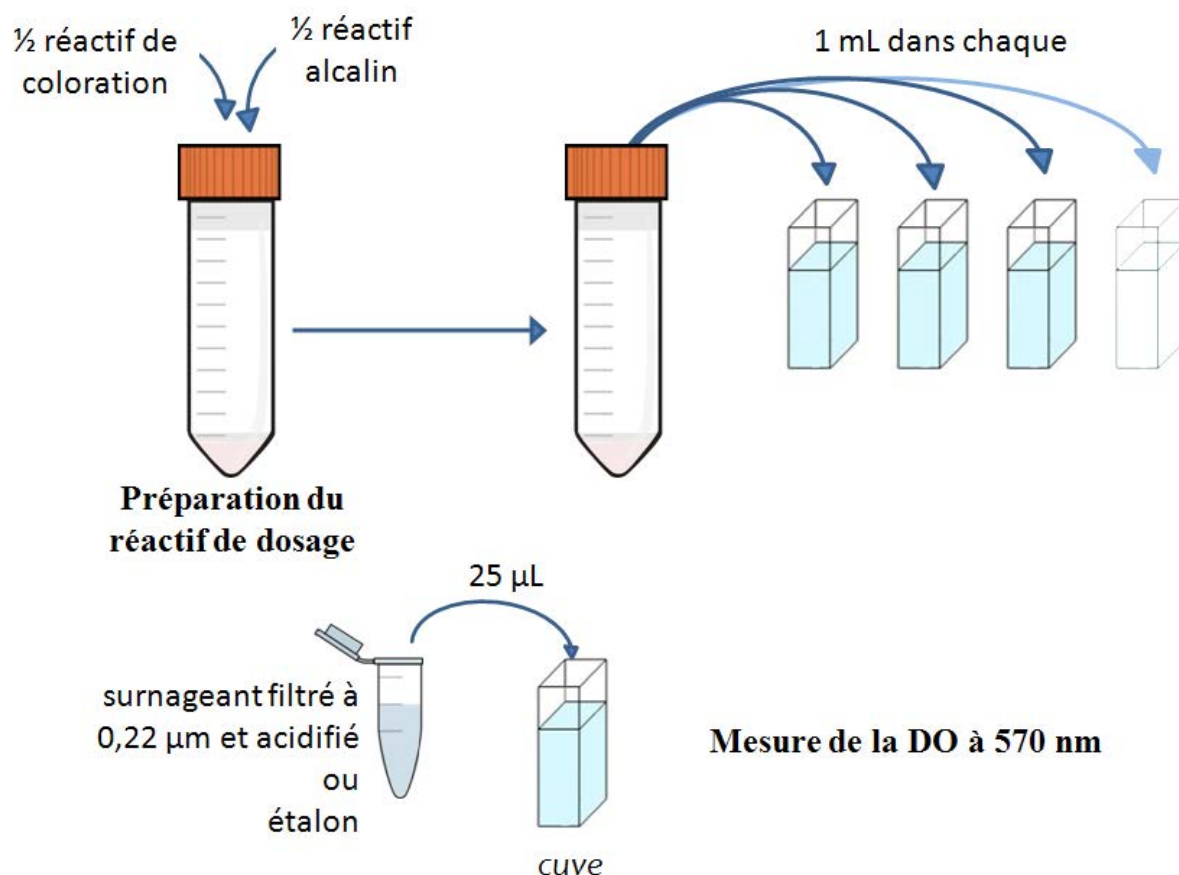


Figure M&M.5 : Schéma de la mesure de la concentration en calcium par colorimétrie.

2.1.2. Mesure des concentrations en cations par ICP-AES

L'ICP-AES permet de déterminer des concentrations en divers éléments. La sensibilité de la technique est meilleure pour les éléments dont les spéciations favorisent les formes cationiques. La précision sur la mesure des concentrations en calcium est notamment meilleure que la mesure par colorimétrie. Les analyses ont été faites par Laure Cordier, assistante ingénieure à l'Institut de Physique du Globe de Paris (IPGP) sur un iCAP6200 Thermofisher avec un passeur cetac ASX-520.

Suivant l'échantillon, un volume de 200-350 μL a été dilué dans 10 mL de HNO_3 2 % (en masse) en utilisant une balance de précision. Les dilutions peuvent être stockées à

4 °C. Trois mesures sont faites pour chaque échantillon préalablement dilué ce qui permet d'avoir un écart-type sur la mesure pour chaque élément. La solution utilisée pour la dilution est analysée et ses valeurs sont soustraites à celles mesurées pour chaque échantillon. L'écart-type sur la mesure de la solution utilisée pour diluer les solutions correspond à la limite de détection de la mesure. Néanmoins quand la limite de détection théorique (donnée par le fabricant) est plus grande, celle-ci prévaut.

Les limites de quantification dans les échantillons sont données dans le Tableau M&M.4.

Des solutions de cultures de cyanobactéries ont été dosées en colorimétrie (cf. § 2.1.1) et en ICP-AES. Les concentrations en calcium dans certaines solutions sont très proches entre la mesure par colorimétrie et l'ICP-AES et dans d'autres, l'écart est plus grand : on peut mesurer de 1,3 à 21 % d'écart. L'ICP-AES est une technique plus sensible que la colorimétrie mais la mesure de la concentration en calcium par colorimétrie est plus rapide et moins coûteuse.

Tableau M&M.4 : Limites de détection et de quantification du magnésium, calcium, strontium et baryum par la techniques ICP-AES.

élément	longueur d'onde (nm)	visée	Limite de détection théorique de la mesure (ppb)	Limite de détection calculée dans l'échantillon (µM)
magnésium	279,55	radiale	0,20	0,25
calcium	396,85	radiale	0,50	0,37
strontium	404,77	axiale	0,14*	0,05
baryum	233,53	axiale	0,30	0,07

* limite correspondante à l'écart-type de la mesure du blanc

2.1.3. Dosage de P et N

La colorimétrie en flux continu est utilisée pour mesurer les concentrations en phosphore (sous forme de PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} et H_2PO_4^-) et en azote (NH_3 et NH_4^+). Les analyses ont été faites par Emmanuelle Rimbault (IPGP) sur un QuAAtro Axflow de Seal Analytical. Les échantillons ont été dilués dans de l'eau MilliQ, 1 mL dans 14 mL d'eau pour les phosphates (par pesée pour plus de précision) soit au 1/15ème, et 200 µL de cette première dilution dans 10 mL d'eau pour le nitrite et le nitrate soit une dilution totale au 1/750ème.

2.1.4. Mesure des concentrations en anions par chromatographie ionique

La chromatographie ionique a permis de mesurer les concentrations en fluorure, chlorure, sulfate, nitrite et nitrate dans les solutions de culture des cyanobactéries. Les analyses ont été faites par Laure Cordier (IPGP) avec un ICS1100 Thermofisher, sur une colonne Ionpac thermo AS14, avec un éluant composé de 3,5 mM de Na_2CO_3 et de 1 mM de NaHCO_3 à un débit de 1,2 mL/min. Les nitrites et nitrates ont été mesurés avec un détecteur UVD340U. Cette technique est complémentaire de l'ICP-AES et des dosages colorimétriques, elle permet de doser les éléments mesurés avec peu de précisions (notamment les anions) en ICP-AES.

2.1.5. Mesure de l'alcalinité et détermination du carbone inorganique soluble

L'alcalinité est la capacité quantitative d'une solution aqueuse à neutraliser un acide. La mesure de l'alcalinité a été faite par colorimétrie. Sont préparées : une solution d'acide formique 3,5 mM avec 30 mg/L de bleu de bromothymol, une solution à 0,2 M de NaCl et une gamme étalon de NaHCO_3 allant de 0,5 à 3,5 mM par pas de 0,25 mM. Pour la mesure, 500 μL d'échantillon ou d'étalon sont ajoutés à 500 μL de réactif dans des cuves de 1 mL qui ont une longueur de trajet optique de 1 cm.

Un échantillon de l'eau Volvic et des dilutions de l'eau Evian ont également été dosés pour vérifier l'exactitude de la mesure. Une relation de type équation du second degré est établie entre la DO à 590 nm (absorption par la forme basique de l'indicateur) et l'alcalinité (Figure M&M.6). La moyenne des écarts aux valeurs théoriques est de 3 %. Cette valeur fournit l'écart-type utilisé sur chaque mesure. Certains échantillons sont dilués 2 ou 10 fois.

La valeur mesurée est l'alcalinité totale qui correspond à :

$$[\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{HPO}_4^{2-}] + 2[\text{PO}_4^{3-}] + [\text{H}_3\text{SiO}_4^-] + [\text{NH}_3] + [\text{H}_2\text{BO}_3^-] + [\text{OH}^-]$$

Les pKa des espèces prises en compte dans cette formule par les différentes techniques énoncées précédemment (§ 2.1.2, § 2.1.3, § 2.1.4) et le pH de la solution permettent de déterminer les concentrations de HCO_3^- et de CO_3^{2-} .

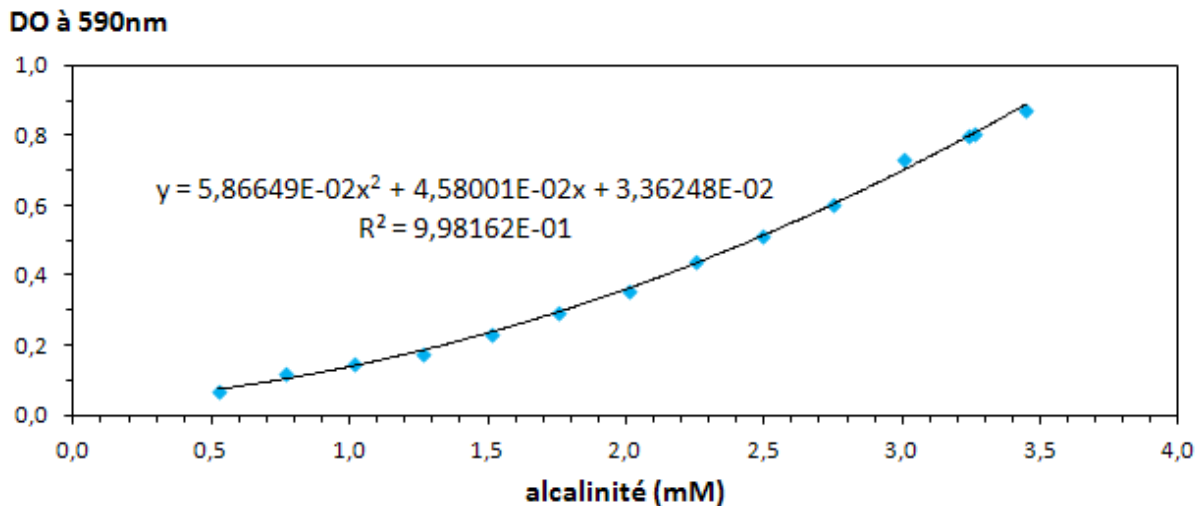


Figure M&M.6 : Étalonnage de la mesure de l'alcalinité par colorimétrie.

2.1.6. Calculs de saturation par le logiciel de spéciation chimique Visual MINTEQ ver. 3.0

Visual MINTEQ est un logiciel d'équilibre chimique qui permet des calculs de spéciation, de solubilité et d'équilibre entre des phases solides et dissoutes de minéraux (Gustafsson, 2013). La méthode de correction des activités utilisée a été celle de Davies (Davies et al., 1962). La pression partielle en CO_2 de la phase gaz, qui est considérée en équilibre avec les solutions, est maintenue constante à 0,00038 atm. Après avoir sélectionné les éléments présents dans une solution, leurs concentrations mesurées et la température, on obtient les concentrations et les activités de chaque espèce, le pH, la force ionique et les saturations des solutions vis-à-vis des différentes phases minérales possibles. Les précipitations ne sont pas permises, ainsi nous pouvons déterminer l'indice de saturation quand les solutions sont sursaturées. Les températures injectées dans le code de calcul sont celles des incubateurs utilisés pour cultiver les différentes souches (30 ou 45 °C). Ce logiciel est utilisé pour déterminer des saturations de phases comme les carbonates (Siong and Asaeda, 2009). L'indice de saturation est défini comme :

$$-\log (\text{produit des activité}/\text{constante de solubilité})$$

2.2. Analyse par diffraction des rayons x de cyanobactéries en fonction de la température (25-900 °C)

Des culots cellulaires de cyanobactéries ont été lyophilisés plusieurs jours sous 40 mbar à -40 °C. Puis ces culots ont été placés sur des porte-échantillons en alumine. Les mesures ont été faites sur un diffractomètre Panalytical X'Pert Pro MPD avec une source de rayons X correspondant à la raie $K\alpha$ du cuivre. Les réglages suivants ont été utilisés : fentes de Soller de 0,04 rad, un masque de 10 mm, une fente anti-scatter de 1°, une fente de divergence de 0,5°. Les données ont été enregistrées à 40 mV et 40 mA en mode continu sur une gamme d'angles 2θ allant de 3° à 90° avec un pas de 0,017° et un temps total par diffractogramme de 1 h. Les culots cellulaires ont été placés en montage four HTK 1200N (Anton Paar). Une mesure a été faite à température ambiante puis une tous les 50 °C entre 300 et 900 °C.

2.3. Microscopie électronique en transmission

Les observations en microscopie électroniques en transmission ont été faites en mode STEM sur deux appareils différents. Soit sur un JEOL 2100F (FEG) opérant à 200 kV et équipé d'un canon à émission de champs. Dans ce cas, les images ont été faites en mode High Angle Annular Dark Field (HAADF) avec une taille de sonde de 1 nm. Par rapport au mode MET, le STEM-HAADF permet d'obtenir un contraste chimique particulièrement utile pour distinguer les différentes particules intracellulaires (carbonates vs polyphosphates) et aussi les carbonates de différentes compositions (calcium, strontium et baryum). Le deuxième microscope utilisé est un JEOL 2100 avec comme source d'électron, un cristal de LaB_6 . Le mode utilisé est le STEM en champ clair.

Dans les deux cas, les échantillons ont été préparés de la façon suivante : les culots cellulaires ont été centrifugés et lavés 3-4 fois avec de l'eau MilliQ (18 M Ω) pour se débarrasser des sels du milieu extracellulaire. Puis le culot est resuspendu dans de l'eau, de façon à être à une concentration cellulaire constante compatible avec l'observation en microscopie ($DO \sim 1$). Une goutte de moins de 3 μ L est déposée sur une grille MET de 100 ou de 200 carreaux recouverte d'un film de formvar. Pour certaines observations, la grille est préalablement ionisée pendant 30 secondes. L'ionisation génère des charges de surface négatives sur la membrane de carbone. Cette étape permet de rendre la grille hydrophile pour quelques heures (1/2 journée). Ainsi la goutte d'eau déposée mouille la totalité de la grille et les cellules se retrouvent dispersées de façon homogène. En revanche, des cellules déposées sur une grille hydrophobe (non ionisée) ont tendance à s'agréger lors du séchage, rendant les observations en microscopie plus compliquées.

2.4. Mesures de spectre XANES de carbonates et de cyanobactéries

Des cultures de cyanobactéries ont été centrifugées et lavées avec de l'eau MilliQ, puis ces culots ont été séchés dans une étuve à vide. Les poudres obtenues ainsi que des poudres de carbonates synthétisés abiotiquement (cf. Chapitre 2) ont été pressées sur des feuilles d'or puis montées sur un porte-échantillon de cuivre.

Les mesures bulk des spectres XANES au seuil K du carbone des cyanobactéries et des carbonates ont été réalisées sur la ligne de lumière SGM 11ID-1 (CLS, Saskatoon) par Sylvain Bernard, chargé de recherche (IMPMC) et Julien Alléon, actuellement en thèse (IMPMC).

Les spectres XANES ont été obtenus par fluorescence. L'acquisition de 20 à 30 spectres a été nécessaire pour obtenir un spectre moyen de l'échantillon ayant un rapport signal/bruit optimal. Il faut compter 25 secondes pour mesurer l'intensité de la fluorescence sur toute la gamme d'énergie d'absorption du carbone (268–318 eV). Afin d'éviter la mesure de matériel redéposé sous le faisceau, l'échantillon est déplacé après chaque spectre acquis. Le faisceau est ici focalisé sur une zone relativement large (1 mm \times 100 μ m) et le spectre moyen de l'échantillon est donc représentatif d'une zone de 2,5 mm².

Chapitre 1 : Synthèse *in vitro* de carbonates de calcium en conditions abiotiques

1. Introduction

Afin de contraindre les conditions nécessaires pour la formation des carbonates de calcium retrouvés dans les cyanobactéries, nous avons synthétisé abiotiquement des particules de carbonates, substituées ou non par du magnésium, strontium et baryum. Déterminer les conditions pour reproduire des carbonates similaires à ceux observés dans les cyanobactéries biominéralisant intracellulairement (une taille submicrométrique et une faible cristallinité) pourrait nous donner une idée de la composition de la solution dans laquelle la précipitation se produit, à savoir dans le milieu intracellulaire ou bien dans un compartiment intracellulaire.

Les précipités de carbonates de calcium peuvent intégrer du strontium et du baryum (Couradeau et al., 2012). Cette substitution est quantifiée en comparant les rapports élémentaires Sr/Ca et Ba/Ca dans la phase formée avec ces mêmes rapports dans la solution de précipitation. Il est ainsi possible de déterminer un coefficient de partage, qui est égal au rapport élémentaire mesuré dans le précipité divisé par le même rapport dans la solution. Ce coefficient de partage dépend classiquement de la température; cette caractéristique est d'ailleurs utilisée pour déterminer les conditions environnementales passées (Ayalon et al., 1999). Les coefficients de partage du strontium et du baryum sont bien plus grands dans l'aragonite que dans la calcite. Par exemple, à 25 °C, il est de 0,021 pour le strontium et de 0,012 pour le baryum dans la calcite (Tesoriero and Pankow, 1996) et dans l'aragonite, ces coefficients sont de 1,19 pour le strontium et de 1,5 pour le baryum (Dietzel et al., 2004).

En revanche, les coefficients de partage pour le strontium et le baryum ne sont pas connus pour le carbonate de calcium amorphe. On peut donc se demander si la précipitation d'amorphe de carbonate de Ca, Mg, Sr et Ba induit un fractionnement élémentaire différentiel entre les alcalino-terreux. Si oui, alors la précipitation de cette phase dans les cyanobactéries pourrait expliquer la différence de composition entre le milieu de vie des cellules et les carbonates qu'elles forment (cf. introduction, § 1.3).

L'observation par Couradeau et al. (2012) de carbonates de Mg, Ca, Sr et Ba amorphes est la première. De plus, personne n'a jamais essayé de produire des carbonates amorphes de calcium contenant à la fois du magnésium, du strontium et du baryum. Nous nous sommes demandés quelles caractéristiques (taille, structure, forme,

composition) de ces carbonates sont potentiellement influencées ou contrôlées par les cyanobactéries.

2. In vitro synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: What do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria? *Article publié dans Geochimica et Cosmochimica Acta*

Résumé de l'article :

Pour réaliser les synthèses discutées dans ce chapitre, nous avons mélangé une solution contenant du carbone inorganique apporté sous forme de Na_2CO_3 avec une solution contenant le calcium et/ou le magnésium et/ou le strontium et/ou le baryum apportés sous forme de chlorures. Un précipité blanc apparaît immédiatement ; celui-ci est séparé de la phase liquide par centrifugation et est séché à température ambiante. La poudre ainsi obtenue est analysée en diffraction des rayons X et observée en microscopie électronique (MEB et/ou MET). Des analyses en EDXS permettent de connaître la composition chimique du précipité. Plusieurs concentrations des différents éléments en solution ont été testées pour obtenir des carbonates de calcium amorphes contenant les mêmes proportions de magnésium, calcium, strontium et de baryum que celles observées dans les carbonates formés par *G. lithophora*. Les synthèses ne révèlent pas de fractionnement différentiel entre le calcium, le strontium et le baryum durant la précipitation de la phase amorphe. La synthèse abiotique de carbonates similaires à ceux des cyanobactéries permet de faire des analyses difficilement réalisables sur des cellules. Par exemple, des analyses par thermogravimétrie ont permis de mettre en évidence des variations dans la température de cristallisation, donc des variations de stabilité thermique des particules sous atmosphère contrôlée. Les synthèses abiotiques, réalisées en supprimant sélectivement un substituant des carbonates de calcium, permettent d'en apprendre plus sur l'apport de chacun des éléments dans la stabilité de la phase amorphe de carbonate de calcium. Il a également été possible de voir l'effet du temps sur la stabilité des carbonates en solution ou à sec. Les conditions de synthèse, les résultats et la discussion de ces résultats sont exposés ci-après dans l'article publié.

***In vitro* synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: what do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria?**

N. Cam^{a,b}, T. Georgelin^a, M. Jaber^c, J-F. Lambert^a, K. Benzerara^{*b}

^aLaboratoire de Réactivité de Surface (LRS). Sorbonne Universités - UMR CNRS 7197, UPMC Univ Paris 06, 3 rue Galilée, Ivry-sur-Seine, France

^bInstitut de Minéralogie, de Physique des Matériaux, et de Cosmochimie (IMPMC). Sorbonne Universités - UPMC Univ Paris 06, UMR CNRS 7590, Muséum National d'Histoire Naturelle, IRD UMR 206, 4 Place Jussieu, F-75005 Paris, France

^cLaboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale (LAMS). Sorbonne Universités - UMR CNRS 8220, UPMC Univ Paris 06, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France

Corresponding author: Karim Benzerara

Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC)

4 Place Jussieu

75005 Paris, France

Email: Karim.benzerara@impmc.upmc.fr

Phone: +33 1 44 27 75 42

Abstract

Some cyanobacteria, including *Candidatus Gloeomargarita lithophora*, which was isolated from Lake Alchichica (Mexico), can form intracellular carbonates. This contradicts the common paradigm that cyanobacterial calcification is always extracellular and suggests that calcification might be controlled by these cyanobacterial species. Intracellular carbonates have several peculiar characteristics: they are relatively small (between 60 and 500 nm), they are poorly crystalline, and they have Sr/Ca and Ba/Ca ratios much higher than the solution in which the cells grow. It is therefore crucial to understand whether these unique features may indicate the involvement of specific biological processes. Here, *in vitro* abiotic syntheses were performed to synthesize Mg-, Ca-, Sr- and Ba-containing carbonates with compositions, crystallinities and sizes close to those observed in intracellularly calcifying cyanobacteria. Precipitates were characterized by scanning and transmission electron microscopies coupled with energy dispersive x-ray spectroscopy, thermogravimetric analysis and x-ray diffraction. The size and the poor crystallinity of cyanobacterial intracellular carbonates could be mimicked under these abiotic conditions. It was shown that similarly to Mg, elements such as Sr and Ba can favour stabilization of poorly crystalline carbonates. In contrast, the differential partitioning of Sr, Ba and Ca between the solution and the solids as observed in cyanobacteria could not be mimicked *in vitro*. This provides keys to a better understanding of biological processes involved in the formation of intracellular carbonates by some cyanobacteria, including the involvement of membrane transporters.

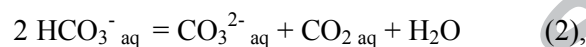
1. INTRODUCTION

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes that occupy a wide array of terrestrial, marine, and freshwater habitats (Badger et al., 2006). They contribute significantly to the global carbon cycle by assimilating CO_2 to organic carbon (Fuhrman, 2003) and by triggering CaCO_3 precipitation (e.g., Verrecchia et al., 1995; Kamennaya et al., 2012).

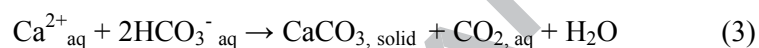
The general reaction of CaCO_3 precipitation can be written as:



This is coupled with the acid-base equilibrium of carbonates, e.g.



Therefore, the CaCO_3 precipitation reaction can be written alternatively as



$$\text{with } (3) = (1) + (2)$$

Cyanobacteria impact that reaction by fixing CO_2 through photosynthesis, hence displacing equilibrium (3) towards the formation of CaCO_3 . More precisely, cyanobacteria usually import carbon under the form of HCO_3^- especially in environments where dissolved CO_2 is limiting. HCO_3^- is then converted to CO_2 within cell compartments called carboxysomes by specific enzymes, i.e. carbonic anhydrases (Kupriyanova and Pronina, 2011). CO_2 is then fixed by the RuBisCO enzyme and transformed into organic carbon while CO_3^{2-} and/or OH^- produced by the carbonic anhydrase reaction are exported to the extracellular medium (e.g., (Kamennaya et al., 2012)). This raises the supersaturation of the surrounding solution with respect to various carbonate minerals. An additional source of oversaturation is provided by an active export of Ca^{2+} from the cells coupled with an import of H^+ (Thompson et al., 1997).

Until recently, calcification by cyanobacteria has been invariably considered as an extracellular process (Merz, 1992). As a result, the CaCO_3 precipitation process and

the chemical composition of the mineral by-products were supposed to be influenced only by the chemical conditions prevailing in the aqueous environment at the cell/solution interface.

However, several species of cyanobacteria have been discovered recently that have the ability to form intracellular carbonate inclusions (Couradeau et al., 2012; Benzerara et al., 2014). Despite the potential importance of such a process (Couradeau et al., 2012; Riding, 2012; Benzerara et al., 2014), the mechanisms involved in the formation of intracellular carbonates by cyanobacteria are as yet unknown. These intracellular carbonates are quite different from usual abiotic carbonates: (1) they appear as nanospheres with a diameter between 60 and 500 nm; (2) they are poorly crystalline as inferred by electron diffraction; (3) in some species, e.g., *Candidatus Gloeomargarita lithophora*, they contain high concentrations of strontium and barium, much higher than in the extracellular solution. For example, the Sr/Ca and Ba/Ca ratios in the intracellular carbonates of *Candidatus G. lithophora* were respectively 86 and 1370 times higher than in the extracellular solution (Couradeau et al. 2012). Interestingly, similarly to what has been observed in *G. lithophora*, an enrichment in Sr and Ba relative to Ca was observed recently in carbonates from the water column of Lake Geneva (Switzerland) by (Jaquet et al., 2013).

The origin of such a high enrichment in Sr and Ba relative to Ca in intracellular precipitates, as well as the mechanism by which such poorly crystalline carbonates are stabilized in cyanobacteria have yet to be determined. In particular, it is crucial to ascertain whether they are indicative of a biological control or the result of non-controlled processes occurring under specific chemical conditions within the cytoplasm of the cells. In turn, relating the chemical and crystallographic features of such inclusions with the chemical environment in which they formed may provide a new approach to constrain the chemical composition of the cytoplasm in microorganisms. *In vitro* experiments have been classically performed for more than 50 years to better understand biomineralization processes (Kitano and Hood, 1965). Such modelling experiments do

not intend to mimic the processes occurring within the cells, which remain unknown, and generally do not provide an ultimate and direct answer as to which biological processes are involved in biomineralization. Yet, these experiments constrain to some extent the chemical conditions necessary to produce mineral phases *in vitro* similar to those observed in organisms.

In the present study, we have conducted abiotic precipitation experiments under various conditions and we have systematically analyzed the solid products by x-ray diffraction (XRD), scanning and transmission electron microscopies (SEM and TEM) and thermogravimetric analyses (TGA) with the objective to mimic some of the chemical and crystallographic properties observed in cyanobacterial intracellular carbonates. From the comparison between the *in vitro* abiotic precipitates and cyanobacterial inclusions, we discuss the implications for intracellular carbonate biomineralization.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Carbonate syntheses

Carbonates were synthesized by direct precipitation in aqueous solutions containing MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 and Na_2CO_3 or NaHCO_3 . Solutions of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (PROLABO, 98%), CaCl_2 (PROLABO, 99%), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (PROLABO, 99%), $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MERCK, 99%) and NaHCO_3 (SIGMA ALDRICH, 99.5%) were prepared separately. The Na_2CO_3 solution was added to the cation solution (i.e., a mixture of MgCl_2 and/or CaCl_2 and/or SrCl_2 and/or BaCl_2 with varying ratios) while stirring. In one experiment, NaHCO_3 was added to the cation solution. The pH of the different experiments are reported in Table 1. For each experiment, a white precipitate appeared instantaneously. The suspension was then centrifuged for 10 minutes at 8200 g and the supernatant was discarded. The pellet was spread on a Petri dish and dried at room temperature.

2.2 Saturation indices calculation

Saturation indices were calculated using the Visual Minteq 3.0 software. They correspond to the logarithm of the ion activity product divided by the solubility product of the mineral phase of interest. The solubility product of amorphous calcium carbonate used in the present study was obtained by Kellermeier et al. (2014).

2.3 Scanning electron microscopy coupled with energy dispersive x-ray spectrometry

Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained on gold-coated samples using a Hitachi SU-70 SEM-FEG equipped with a field emission gun. Images were acquired with the microscope operating at 10 kV, and a working distance of ~15 mm in the secondary electron mode using a SE (Lower) detector. Energy dispersive x-ray spectrometry (EDXS) analyses were performed using a Zeiss Ultra 55 SEM-FEG on carbon coated samples at 10 kV and a working distance of ~7.5 mm. The spot size was about 50 nm with a total acquisition time of 5 seconds. Around ten acquisition areas were used for each sample to determine the average composition. Semi-quantitative analysis of EDXS data was performed with the INCA software using a XPP matrix correction and reference spectra acquired on standard samples. The K α lines of Mg and Ca and L α lines of Sr and Ba were used for quantification.

2.4 Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) analyses were performed in the bright field mode using a JEOL 2100F operating at 200 kV and equipped with a field emission gun, a high-resolution UHR pole piece, and a Gatan energy filter GIF 200. Samples were prepared as fine powders by grinding in absolute ethanol in a mortar. Three microliters of this suspension were deposited on a copper grid covered with a carbon membrane.

2.5 X-ray diffraction

Bulk samples were analyzed by x-ray diffraction (XRD). A few milligrams of the samples were ground in an agate mortar in pure acetone. Powders were deposited on monocrystalline silicon sample holders. XRD measurements were performed using the Cu

K α radiation on a Panalytical X'Pert Pro MPD diffractometer. The following settings were used: the Soller slit was open at 0.04 rad; a beam mask of 20 mm, a divergence slit of 1/4 ° and an anti-scatter slit of 1/2 ° were inserted. Data were recorded at 40 kV and 40 mA in the 2 θ continuous-scan mode over a 4-120° 2 θ range with a step of 0.017° and a total counting time of ~5 h. XRD data were analyzed using the Panalytical X'Pert Highscore software for background subtraction.

2.6 Thermogravimetric analysis-Differential scanning calorimetry

Thermogravimetric analysis-Differential scanning calorimetry (TGA-DSC) analyses were performed using a SDT Q 600 TA. Around 10 mg of powder were placed in an aluminum crucible and the sample was heated up to 900 °C under a 100 mL/min air flow. The temperature scanning rate was set at 5 °C per minute.

2.7 Mass spectrometry

The mass spectrometry analyses were coupled with the TGA-DSC analyses on a ThermoStar™ GSD 301 T3 (Pfeiffer Vacuum). The signal corresponding to 44 amu (CO₂⁺) was recorded.

3. RESULTS

In a first experiment, called “stoichiometric conditions”, MgCl₂, CaCl₂, SrCl₂, BaCl₂ and Na₂CO₃ were mixed in a solution with relative proportions similar to those measured by SEM-EDXS by Couradeau et al. (2012) in *G. lithophora* intracellular inclusions (i.e., Mg = 18%, Ca = 53%, Sr = 8%, Ba = 21%, in atomic ratios relative to the total cation content). Moreover, concentrations were set so that [Na₂CO₃] = [CaCl₂] + [BaCl₂] + [SrCl₂] + [MgCl₂] = 100 mM (Table 1).

A second experiment was performed also under “stoichiometric conditions” at lower concentrations, i.e. with [CO₃] = [Ca] + [Ba] + [Sr] + [Mg] = 10 mM.

Finally, the relative proportions of Ca, Mg, Sr and Ba added to the solution were varied to test the impact of such compositional variations of the solution on the crystallinity and chemical composition of resulting precipitates.

3.1. Precipitation of *G. lithophora*-like carbonates under stoichiometric conditions at high carbonate concentration (100 mM)

The precipitate formed in the presence of a total carbonate ion concentration of 100 mM (provided as Na₂CO₃) and dried at 20 °C without prior rinsing, was composed of particles measuring 48 ± 19 nm in diameter (measured on 146 particles). The precipitates contained Ca, Mg, Sr, Ba in the same relative proportion as in the initial solution (Fig. 1). The diffractogram revealed the presence of two phases: (1) a poorly crystalline phase with broad peaks centered at 30°, 45° and 65° (2 θ) attributed to a (Ca-, Mg-, Sr-, Ba)-carbonate phase consistently with TEM observations and former XRD analyses of amorphous calcium carbonates (ACC), and (2) a crystalline phase with narrow peaks centered at 27.4°, 31.7°, 45.5°, 56.5°, 66.3° and 75.3° (2 θ), assigned to NaCl. When collected one month, instead of few minutes, after the mixing of the solutions, the precipitate showed a similar diffractogram, suggesting that the poorly crystalline (Ca, Mg, Sr, Ba)-carbonate phase was relatively stable over time. When the synthesis was performed at a lower initial pH of 8.77, with carbonates provided as NaHCO₃, precipitation occurred slower and the precipitate was a crystalline (Ca, Sr, Ba)-carbonate containing low amounts of Mg (Fig. 2).

TGA-DSC analyses of the poorly crystalline precipitates formed in Na₂CO₃-containing solutions showed four weight loss events (Fig. 1). The first event with a maximum at 77 °C was attributed to the loss of adsorbed and/or structural water. The peak extended up to about 300 °C, indicating that part of this water was strongly retained. The total water content amounted to 20% of the weight of the solid remaining at 300 °C. Overall, this corresponded to a water content of 0.86 water molecule per carbonate. Therefore, by coupling the TGA and EDXS data (Fig. 1), the stoichiometric formula of the precipitate could be written as Mg_{0.16}Ca_{0.51}Sr_{0.08}Ba_{0.25}CO₃·0.86H₂O.

The second loss event showed a sharp maximum at 345 °C. It was associated with CO₂ release as followed by mass spectrometry and a strongly exothermic event as shown by DSC. The total weight loss during this event amounted to 3.7 to 4.0% of the dry weight. Therefore, this event could be interpreted as a partial decomposition (11-12%) of the carbonates.

A third weight loss was observed between 500 and 700 °C. It also closely matched CO₂ release but it was associated with a clear endothermic effect on the heat flow curve. This loss amounted to 16.5 to 17.7% of the dry weight, i.e., 47 to 51% of total carbonate.

Overall, the amount of carbonate decomposed in the second event ($T_{\max} = 345$ °C) roughly corresponded to the Mg content of the solid phase, while the amount decomposed in the third event ($T_{\max} = 637$ °C) closely corresponded to its Ca content, suggesting a multi-step carbonate decomposition (MgCO₃ first; CaCO₃ second; SrCO₃ and BaCO₃ above 710 °C). XRD analyses were performed on the solid phase before and after the second weight loss event, at 325 °C and 375 °C, respectively (Fig. 1). An increased amount of calcite was detected at 375 °C, suggesting that the initially amorphous mixed carbonate crystallized at 345 °C, causing the segregation of MgCO₃ which decomposed at this temperature. The start of a fourth weight loss above 710 °C and not completed at 800 °C, might be consistent with the decomposition of a residual (Sr,Ba)-carbonate phase.

3.2. Precipitation of *G. lithophora*-like carbonates under stoichiometric conditions at low carbonate concentration (10 mM)

Syntheses were carried out using lower total concentrations of carbonate anions and divalent cations (10 mM instead of 100 mM). The relative proportions of Mg, Ca, Sr and Ba were kept similar to those measured in *G. lithophora* intracellular inclusions (Table 1). The resulting precipitate was not rinsed and was dried at 20 °C. The precipitate showed a broad XRD diffraction peak around 30° (2 θ), consistent with a poorly crystalline (Ca, Sr, Mg, Ba)-carbonate phase (Fig. 3). No NaCl was detected, likely due to

the lower reactant concentrations. TEM observations showed that it was composed of spheres with an average diameter of 126 ± 32 nm (measurements on 385 particles; Fig. 3). Based on TGA and EDXS analyses, the average chemical composition of the precipitate was determined to be $\text{Mg}_{0.04}\text{Ca}_{0.61}\text{Sr}_{0.06}\text{Ba}_{0.29}\text{CO}_3 \cdot 0.84\text{H}_2\text{O}$. The precipitate contained much lower Mg than the solid formed at high carbonate and divalent cation concentrations. In contrast, the water content and the relative Sr/Ca, and Ba/Ca ratios were similar.

In TGA, water loss occurred in two steps at low temperatures, and the main weight loss event occurred at 670°C . An exothermic event, not associated with weight loss was recorded at 354°C by TGA-DSC (Fig. 3) and was attributed to crystallization of the carbonate phase without decarbonation. This contrasted with what was observed for the precipitate formed at high carbonate and divalent cation concentrations, for which crystallization was associated with the decomposition of MgCO_3 .

Rinsing with milliQ water induced the transformation of the poorly crystalline phase into a substituted calcite phase as shown by XRD (Fig. 3). Moreover, when collected one month instead of few minutes after mixing the solution, the precipitate consisted mostly in crystalline calcite with a small amount of monohydrocalcite as shown by XRD (Fig. 3).

3.3. Precipitation of carbonates at low carbonate concentration and varying Sr/Ca/Mg and Ba relative proportions

To test whether a poorly crystalline Mg-rich carbonate phase could be formed at low carbonate concentration ($[\text{CO}_3] = 10$ mM), an additional synthesis was performed in a solution containing a higher Mg^{2+} concentration, with the following molar ratios: Mg: 55%, Ca: 29%, Sr: 4% Ba: 12% (Table 1). The precipitate appeared by TEM as spheres larger than in the previous syntheses, with an average diameter of 192 ± 44 nm as measured on 178 particles (Fig. 4). The elemental composition was $\text{Mg}_{0.16}\text{Ca}_{0.51}\text{Sr}_{0.05}\text{Ba}_{0.28}\text{CO}_3$, i.e. close to the precipitate formed in the experiment at high carbonate and divalent cation concentrations (100 mM). The XRD pattern indicated that the precipitate was poorly crystalline. TGA analyses showed a relatively high water

amount of 1.03 molecules per carbonate with two distinct water loss events at 80 and 220 °C. DSC indicated an exothermic crystallization event at 370 °C, which was immediately followed by a small CO₂ loss (corresponding to the decomposition of 0.02 carbonate per formula unit). The main decarbonation event, corresponding to the decomposition of 0.61 carbonate per formula unit, showed a maximum at 670 °C.

Additionally, syntheses were conducted without adding (1) Mg, (2) Sr, (3) Ba or (4) Sr and Ba in the solution in order to assess the influence of these elements on the size and the crystallinity of the precipitates.

In the absence of Mg²⁺ in the solution, particles were much larger (4-5 µm) than in previous syntheses (Fig. 5). Their elemental composition was close to that of the solution, with no preferential incorporation of Ca, Sr or Ba in the solid (Table 1). The precipitate consisted in well-crystallized calcite substituted by Sr and Ba (Fig. 5), with the following stoichiometry: Ca_{0.59}Sr_{0.07}Ba_{0.34}CO₃. TGA analyses showed the presence of only minor amounts of physisorbed water (1.4% in weight) and decarbonation occurred between 500 and 700 °C (corresponding to the decomposition of 0.60 carbonates per formula unit).

When no Sr or Ba was added to the solution, precipitates appeared as spheres with a diameter of 181 ± 46 nm and 268 ± 61 nm, respectively (Fig. 6-7). These spheres were poorly crystalline as shown by XRD. Similarly to all other experiments, no differential partitioning of Ca, Ba and Sr was evidenced between the solution and the precipitate. The Sr-free sample contained 0.93 water molecules per carbonate (Fig. 6) and showed a crystallization peak at 379 °C. The Ba-free sample contained 0.88 water molecules per carbonate and no crystallization was detected on the heat flow curve (Fig. 7). In both cases, the precipitates crystallized when left in solution for one month. The synthesis with Sr resulted in the formation of a monohydrocalcite phase (Fig. 6) and the synthesis with Ba resulted in a mix of monohydrocalcite and aragonite phases (Fig. 7). Finally, monohydrocalcite formed when neither Sr nor Ba was added

to the initial solution (Fig. 8). The precipitate appeared as spherulites measuring between 4 and 5 μm in diameter. Monohydrocalcite contained around 25 at% of Mg.

4. DISCUSSION

Over the last twenty years, amorphous calcium carbonates (ACC) have been increasingly detected in diverse samples, including biomineralizing systems (e.g., Gebauer et al., 2008; Weiner and Addadi, 2011; Cartwright et al., 2012). It has been shown that ACC are relatively unstable with an enthalpy of crystallization of $-17.1 \pm 0.7 \text{ kJ/mol}$ (Radha et al., 2012), and a high solubility product, i.e. $2.32 \pm 0.41 \times 10^{-8} \text{ M}^2$ at pH 9 (Kellermeier et al., 2014). Magnesium, some phosphorylated amino acids (Bentov et al., 2010), serine- and glycine-rich proteins (Aizenberg et al., 1996) as well as confinement (Stephens et al., 2010) have been shown to stabilize ACC. Therefore, these different parameters, i.e., high Mg contents, presence of biomolecules or confinement within intracellular vesicles, may play a role in the stabilization of amorphous carbonate inclusions within intracellularly calcifying cyanobacteria. Alternatively, the high Sr and Ba contents might be additional drivers but no previous study has investigated that potential effect. In the following sections, we compare the results obtained on synthesized amorphous Ca-, Mg-, Sr- and Ba-containing carbonates with previous studies which focused mostly on ACC and amorphous magnesium carbonates (AMC). We then discuss the implications on our understanding of the mechanisms involved in intracellular carbonate formation by cyanobacteria.

4.1 Formation of amorphous Ca-, Mg-, Sr- and Ba-carbonates

In the present study, we reported the formation of an amorphous Ca-, Sr-, Ba- and Mg- containing carbonate. This phase contained around one molecule of water per carbonate similarly to what has been often observed in abiotic (Brečević and Nielsen, 1989; Michel et al., 2008; Radha et al., 2010; Radha et al., 2012) and biogenic (Levi-

Kalisman et al., 2000) ACC. This water content corresponds to that of « type 1 » ACC, observed in the early stage of sea urchin spicule biomineralization (Politi et al., 2008).

The formation and stabilization of ACC (Gebauer et al., 2010; Fernandez-Martinez et al., 2013; Ihli et al., 2013a), AMC (Jiang et al., 2010; Radha et al., 2012; Liu et al., 2013) and amorphous iron (II) carbonate (AFC, Sel et al., 2012) have been widely studied. Similarly to what has been described for ACC and AMC, amorphous (Ca, Sr, Ba, Mg)-carbonates were fairly unstable as shown by the fact that quick milliQ water rinsing induced their crystallization into a Mg-, Sr- and Ba-substituted calcite.

The crystallization temperature of amorphous Ca-, Mg-, Sr- and Ba-carbonates synthesized in the present study ranged between 345 and 390 °C, which is compatible with the 320-350 °C temperature range measured at higher temperature scanning rates for various ACC and AMC by previous studies (Koga et al., 1998; Radha et al., 2010; Radha et al., 2012; Ihli et al., 2013b). It should be noted that the variations of the crystallization temperature were not correlated with (1) the proportions of Mg, Ca, Sr, or Ba, (2) the amount of water molecules per carbonate or (3) the pH of the precipitating solutions. Alternatively, such variations may parallel the variations of the average size of the precipitates, with crystallization temperature increasing with the particle size, although uncertainties on particle sizes are high. Modelling of prenucleation of nanoparticles suggests that particle stability increases with growing diameter, which supports the present observations (Navrotsky, 2004; Gebauer et al., 2008; Meldrum and Sear, 2008; Raiteri and Gale, 2010). However, Koga et al. (1998) observed the opposite effect: the crystallization temperature actually increased with the decrease of the particle size (and it increased with the pH of the precipitating solution). The crystallization temperature may thus depend on related but different parameters such as the supersaturation of the precipitating solution. A possible explanation for the discrepancies between the cited studies might be the effect of Mg adsorbed on the particles surface, since Ihli et al. (2013b) showed that addition of Mg in the precipitation solution had a strong effect on the temperature of crystallization of the ACC. Mg is known to inhibit calcium carbonate

crystallization and to favor ACC (Loste et al., 2003; Rodriguez-Blanco et al., 2012). The intensity of inhibition was shown to depend on the Mg/Ca ratio of the precipitating solution. For example, Loste et al. (2003) showed that in a solution with a 4:1 Mg:Ca ratio, the precipitate crystallized in less than 30 min, while a 10:1 Mg:Ca ratio was required to preserve ACC for more than 24 h. In our study, the Mg:Ca ratio was less than 2:1 in several experiments where amorphous carbonates precipitated. Interestingly, the addition of Sr or Ba to a Mg- and Ca-containing solution (same initial [Mg] and [CO₃]:[Ca] ratio) resulted in the formation of an amorphous phase (Fig. 6-8). In contrast, the synthesis with only Ca, Sr and Ba and no Mg resulted in the formation of crystalline calcite (Fig. 5). Overall, these observations show that, although Sr and Ba alone do not induce the formation of amorphous carbonates, they increase the stability of the amorphous phase, synergistically in the presence of Mg.

4.2 Relative partitioning of Sr, Ba and Ca between the solution and the precipitates

Many studies have examined the partitioning of Sr and Ba compared to that of Ca between the solution and different crystalline calcium carbonate phases (Kinsman and Holland, 1969; Lorens, 1981; Mucci and Morse, 1983; Pingitore Jr. and Eastman, 1986; Tesoriero and Pankow, 1996; Dietzel and Usdowski, 1996; Dietzel et al., 2004; Rimstidt et al., 1998). However, most of them used conditions very different from ours for Ca-carbonate precipitation, including low precipitation rates over several hours, seawater-like solutions and/or trace concentrations of Sr or Ba, less than 1000 ppm. Under such conditions, a differential partitioning between the solution and calcite was observed for Sr or Ba vs. Ca: the Sr/Ca and Ba/Ca ratios in substituted calcite were significantly lower than in the solution, e.g., a ratio of 0.021 between Sr/Ca in the solid and Sr/Ca in the solution, and 0.012 between Ba/Ca in the solid and Ba/Ca in the solution at 25 °C (Tesoriero and Pankow, 1996). In contrast, the (Sr,Ba)-calcite synthesized in the present study contained similar Sr/Ca a

Ba/Ca ratios as in the solution. This might be explained by the substantially higher precipitation rates achieved in our experiments (Gebrehiwet et al., 2012). The differential partitioning of Ca, Sr and Ba between the solution and aragonite synthesized by CO₂ diffusion at pH 9 and a [Mg]:[Ca] of 2:1 ([Mg] = 10 mM) was significantly different, as reported in the literature: Sr/Ca and Ba/Ca ratios have been shown to be almost equal in aragonite and its precipitation solution at 25 °C, but lower in aragonite than in the solution when the temperature was increased (Dietzel et al., 2004). For example, the distribution coefficient of Sr, defined as the ratio between Sr/Ca in the solid and Sr/Ca in the solution, was measured as 1.19 in aragonite at 25 °C. The distribution coefficient of Ba was estimated at 1.5 under the same conditions (Dietzel et al., 2004).

So far, no study has assessed the distribution coefficient of Sr and Ba in amorphous carbonates. In the present study, the amorphous carbonate forming at 20 °C had a smaller Sr/Ca ratio than the solution (i.e., a distribution coefficient between 0.7 and 1) and a higher Ba/Ca ratio than the solution (distribution coefficient between 1.2 and 1.4). To the first order however, these distribution coefficients of Ba and Sr between the solution and an amorphous carbonate phase are not much different from those measured for crystalline aragonite and relatively close to 1.

4.3 Implications for intracellular precipitation in *G. lithophora*

The mechanism of amorphous (Ca, Mg, Sr, Ba)-carbonate precipitation within the cytoplasm of intracellularly calcifying cyanobacteria, including *G. lithophora*, is not known yet. Genomic and genetic approaches may provide some crucial keys in the future. However, the particular chemical and crystallographic properties of the carbonate inclusions should also help constraining the conditions under which precipitation occurs. One difficulty in inferring why some cyanobacteria form intracellular carbonates and others do not, is the very limited available information on the chemical composition of the intracellular medium in cyanobacteria. Most of the studies usually assess that Ca²⁺ concentration in the cytoplasm is tightly regulated at very low concentrations. For example, Barrán-Berdón et al. (2011) measured an intracellular Ca²⁺ concentration of

100 nM in *Anabaena* sp. PCC 7120 cells (which do not form intracellular carbonates; Benzerara et al. (2014)), with a peak at 2.6 μM during few seconds when the cells were exposed to environmental pollutants. Such low concentrations are not consistent with the conditions used in our experiments but also incompatible with the formation of intracellular amorphous carbonate inclusions. Indeed, consistently with previous studies on ACC and AMC, the present study stresses the need for high supersaturation levels for the formation of amorphous Ca-, Sr-, Ba- and Mg-carbonates. It can therefore be noted that no valid estimation of intracellular Ca^{2+} concentrations is presently available for intracellularly calcifying cyanobacteria. Interestingly, Yu and Margolin (1997) suggested that relatively high concentrations of free Ca (a few mM) are required at least temporarily in the cytoplasm of *Escherichia coli* to allow polymerization of the tubulin-like protein FtsZ. They encountered the same paradox as in the case of intracellularly calcifying cyanobacteria: while intracellular free Ca concentrations are low, processes such as ACC precipitation require much higher concentrations. Only precise, time- and space-resolved measurements of intracellular free Ca concentration will be able to solve that issue in the future. Badger and Andrews (1982) measured a total inorganic carbon content (mostly corresponding to HCO_3^-) in excess of 30 mM within the cells of *Synechococcus* sp. Nageli RRIMP N1. This is in the same order of magnitude as inorganic concentrations used in the present study. Finally, pH is another issue which determines which major inorganic carbon species is prevalent. Several studies have measured the intracellular pH of diverse cyanobacterial strains. For example, Belkin and Boussiba (1991) measured a pH between 6.8 and 7.9 in *Arthrospira platensis*. Jiang et al. (2013) measured an intracellular pH between 6.9 and 7.5 in a wild type and a mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. These cyanobacterial strains do not form intracellular carbonates (Benzerara et al., 2014). Similarly to calcium concentration, pH was much higher in our in vitro syntheses than in these studies. Future studies will have to determine whether intracellularly calcifying cyanobacteria have specifically a higher

intracellular pH than noncalcifying cyanobacteria, or alternatively whether pH can be locally much higher than in the rest of the cytoplasm of these cells.

Some studies have shown the positive effect of confinement on the stabilization of ACC by limiting the contact between amorphous carbonates and the surrounding solution (Stephens et al., 2010). Other studies have shown the stabilization of amorphous carbonates by specific macromolecules, including glycoproteins, polyphosphate or phosphorylated proteins (Bentov et al., 2010), all of which are potentially present in the cytoplasm of *G. lithophora*. Here we show that the presence of Sr and Ba in addition to Mg might be one additional parameter increasing the stability of poorly crystalline carbonate inclusions in *G. lithophora*.

The cyanobacterium *Candidatus G. lithophora* precipitates poorly crystalline carbonate nanoparticles rich in Sr and Ba. All of these features could be reproduced in the present in vitro experiments. For that purpose, highly supersaturated solutions with significant Sr and Ba concentrations were used. Indeed, the fractionation between the solution and amorphous carbonates was always approximately the same for Sr, Ba and Ca, suggesting that the Sr/Ca and Ba/Ca ratios in the carbonates are about the same as in the precipitating solution. Since Couradeau et al. (2012) measured Sr/Ca and Ba/Ca atomic ratios of 0.14 and 0.39 respectively in the carbonate inclusions of *G. lithophora*, it can be inferred that the cytoplasm of *G. lithophora*, or alternatively the solution in putative vesicles in which these inclusions may form, has the same Sr/Ca and Ba/Ca ratios as the inclusions. These ratios are 86 and 1370 times higher than the respective Sr/Ca and Ba/Ca ratios of the extracellular solution in which *G. lithophora* cells were grown (Couradeau et al., 2012). Therefore, there must be a mechanism inducing concentration of Sr and Ba over Ca between the extracellular and the intracellular medium of *G. lithophora*.

A few previous studies have shown an enrichment in Sr or Ba over Ca in biological systems. For example, distribution coefficients of Sr and Ba are different in coccoliths of

Emiliania huxleyi compared to inorganically precipitated calcite (Langer et al., 2006; Payne et al., 2008; Langer et al., 2009). This has been interpreted as the result of the compartmentation of *E. huxleyi* cytoplasm and the functioning of specific transporters, which accumulate Sr and Ba in the vesicles where coccoliths are formed.

Similarly, selective sequestration of Sr has also been observed in the desmid green alga *Closterium moniliferum* (Krejci et al., 2011). Krejci et al. (2011) suggested that Ca and Sr were transported inward and outward of the cells by the same channels but since the precipitates formed by these cells were sulfates, they favored the hypothesis that concentration of Sr over Ca was the result of the lower solubility of Sr-sulfates compared to Ca-sulfates. In other word, they suggested that differential fractionation of Sr and Ca between the extracellular solution and the solids was due to mineral precipitation and not biological transport processes as in the coccolith scenario. Since no precursor Sr-, Ca-, or Ba-sulfate phase could be detected in *G. lithophora*, and since the partitioning between the solution and amorphous carbonates is approximately the same for Ca, Sr and Ba, we favor the hypothesis that there are channels and/or transporters which transport Ca, Sr and Ba at different rates in *G. lithophora*. The regulation of intracellular Ca^{2+} concentration results from the balance between Ca^{2+} influx via channels and Ca^{2+} efflux via active transporters (Waditee et al., 2004). Several Ca^{2+} transporters have been identified and studied (e.g., Waditee et al., 2004; Jiang et al., 2013), but their chemical selectivity will need to be characterized in the future.

Sr/Ca and Ba/Ca ratios in carbonates have often been used as proxies to reconstruct paleoenvironment (e.g., Kunioka et al., 2006; Meibom et al., 2008). The possibility that some biological processes alter these signals is thus important to evaluate.

5. CONCLUSIONS

We produced *in vitro* carbonates with the same shape, size, and chemical composition as those observed in *G. lithophora*. While the poor crystallinity, the shape and the

small size may also be impacted by the macromolecules contained within the cells, the present experiments suggest that Sr/Ca and Ba/Ca ratios were the same in the cytoplasm as in amorphous carbonate inclusions, therefore requiring some mechanisms concentrating Sr and Ba over Ca between the extracellular and intracellular medium of the cells. This kind of *in vitro* approach shows that intracellular inclusions found within bacteria can provide some keys to the chemical composition of the intracellular solution in these bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank David Montero, Institut des Matériaux de Paris Centre and Région Ile-de-France for SEM-EDXS analyses and Guillaume Morin for help in diffractogram interpretation.

Nithavong Cam was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02, and more specifically within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE.

Karim Benzerara has been supported by funding from the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013 Grant Agreement no.307110 - ERC CALCYAN).

The TEM facility at IMPMC was purchased owing to a support by Region Ile de France grant SESAME 2000 E 1435. The SEM facility at IMPMC was purchased owing to a support by Région Ile de France grant SESAME 2006 I-07-593/R.

REFERENCES

- Aizenberg J., Lambert G., Addadi L. and Weiner S. (1996) Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates. *Adv. Mater.* **8**, 222–226.
- Badger M. R. and Andrews T. J. (1982) Photosynthesis and Inorganic Carbon Usage by the Marine Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* **70**, 517–523.
- Badger M. R., Price G. D., Long B. M. and Woodger F. J. (2006) The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J. Exp. Bot.* **57**, 249–265.
- Barrán-Berdón A. L., Rodea-Palomares I., Leganés F. and Fernández-Piñas F. (2011) Free Ca²⁺ as an early intracellular biomarker of exposure of cyanobacteria to environmental pollution. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 1015–1029.
- Belkin S. and Boussiba S. (1991) High internal pH conveys ammonia resistance in spirulina platensis. *Bioresour. Technol.* **38**, 167–169.
- Bentov S., Weil S., Glazer L., Sagi A. and Berman A. (2010) Stabilization of amorphous calcium carbonate by phosphate rich organic matrix proteins and by single phosphoamino acids. *J. Struct. Biol.* **171**, 207–215.
- Benzerara K., Skouri-Panet F., Li J., Férard C., Gugger M., Laurent T., Couradeau E., Ragon M., Cosmidis J., Menguy N., Margaret-Oliver I., Tavera R., López-García P. and Moreira D. (2014) Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 10933–10938.
- Brečević L. and Nielsen A. E. (1989) Solubility of amorphous calcium carbonate. *J. Cryst. Growth* **98**, 504–510.
- Cartwright J. H. E., Checa A. G., Gale J. D., Gebauer D. and Sainz-Díaz C. I. (2012) Calcium Carbonate Polyamorphism and Its Role in Biomineralization: How Many Amorphous Calcium Carbonates Are There? *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 11960–11970.
- Couradeau E., Benzerara K., Gerard E., Moreira D., Bernard S., Brown G. E. and Lopez- Garcia P. (2012) An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science* **336**, 459–462.

Dietzel M. and Usdowski E. (1996) Coprecipitation of Ni^{2+} , Co^{2+} , and Mn^{2+} with galena and covellite, and of Sr^{2+} with calcite during crystallization via diffusion of H_2S and CO_2 through polyethylene at 20°C: Power law and Nernst law control of trace element partitioning. *Chem. Geol.* **131**, 55–65.

Dietzel M., Gussone N. and Eisenhauer A. (2004) Co-precipitation of Sr^{2+} and Ba^{2+} with aragonite by membrane diffusion of CO_2 between 10 and 50 °C. *Chem. Geol.* **203**, 139–151.

Fernandez-Martinez A., Kalkan B., Clark S. M. and Waychunas G. A. (2013) Pressure- Induced Polyamorphism and Formation of “Aragonitic” Amorphous Calcium Carbonate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 8354–8357.

Fuhrman J. (2003) Genome sequences from the sea. *Nature* **424**, 1001–1002.

Gebauer D., Völkel A. and Cölfen H. (2008) Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters. *Science* **322**, 1819–1822.

Gebauer D., Gunawidjaja P. N., Ko J. Y. P., Bacsik Z., Aziz B., Liu L., Hu Y., Bergström L., Tai C.-W., Sham T.-K., Edén M. and Hedin N. (2010) Proto-Calcite and Proto-Vaterite in Amorphous Calcium Carbonates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 8889–8891.

Gebrehiwet T. A., Redden G. D., Fujita Y., Beig M. S. and Smith R. W. (2012) The Effect of the CO_3^{2-} to Ca^{2+} Ion activity ratio on calcite precipitation kinetics and Sr^{2+} partitioning. *Geochem. Trans.* **13**, 1.

Ihli J., Kulak A. N. and Meldrum F. C. (2013a) Freeze-drying yields stable and pure amorphous calcium carbonate (ACC). *Chem. Commun.* **49**, 3134.

Ihli J., Kim Y.-Y., Noel E. H. and Meldrum F. C. (2013b) The Effect of Additives on Amorphous Calcium Carbonate (ACC): Janus Behavior in Solution and the Solid State. *Adv. Funct. Mater.* **23**, 1575–1585.

Jaquet J.-M., Nirel P. and Martignier A. (2013) Preliminary investigations on picoplankton-related precipitation of alkaline-earth metal carbonates in meso-oligotrophic lake Geneva (Switzerland). *J. Limnol.* **72**, 592–605.

Jiang H.-B., Cheng H.-M., Gao K.-S. and Qiu B.-S. (2013) Inactivation of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ Exchanger in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Promotes Cyanobacterial Calcification by Upregulating CO_2 -Concentrating Mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4048–4055.

Jiang J., Gao M.-R., Qiu Y.-H. and Yu S.-H. (2010) Gram-scale, low-cost, rapid synthesis of highly stable Mg-ACC nanoparticles and their long-term preservation. *Nanoscale* **2**, 2358–2361.

Kamennaya N. A., Ajo-Franklin C. M., Northen T. and Jansson C. (2012) Cyanobacteria as Biocatalysts for Carbonate Mineralization. *Minerals* **2**, 338–364.

Kellermeier M., Picker A., Kempter A., Cölfen H. and Gebauer D. (2014) A Straightforward Treatment of Activity in Aqueous CaCO_3 Solutions and the Consequences for Nucleation Theory. *Adv. Mater.* **26**, 752–757.

- Kinsman D. J. J. and Holland H. D. (1969) The co-precipitation of cations with CaCO_3 —IV. The co-precipitation of Sr^{2+} with aragonite between 16° and 96°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* **33**, 1–17.
- Kitano Y. and Hood D. W. (1965) The influence of organic material on the polymorphic crystallization of calcium carbonate. *Geochim. Cosmochim. Acta* **29**, 29–41.
- Koga N., Nakagoe Y. and Tanaka H. (1998) Crystallization of amorphous calcium carbonate. *Thermochim. Acta* **318**, 239–244.
- Krejci M. R., Wasserman B., Finney L., McNulty I., Legnini D., Vogt S. and Joester D. (2011) Selectivity in biomineralization of barium and strontium. *J. Struct. Biol.* **176**, 192–202.
- Kunioka D., Shirai K., Takahata N., Sano Y., Toyofuku T. and Ujiie Y. (2006) Microdistribution of Mg/Ca, Sr/Ca, and Ba/Ca ratios in *Pulleniatina obliquiloculata* test by using a NanoSIMS: Implication for the vital effect mechanism. *Geochem. Geophys. Geosystems* **7**, Q12P20.
- Kupriyanova E. V. and Pronina N. A. (2011) Carbonic anhydrase: Enzyme that has transformed the biosphere. *Russ. J. Plant Physiol.* **58**, 197–209.
- Langer G., Gussone N., Nehrke G., Riebesell U., Eisenhauer A., Kuhnert H., Rost B., Trimborn S. and Thoms S. (2006) Coccolith strontium to calcium ratios in *Emiliania huxleyi*: The dependence on seawater strontium and calcium concentrations. *Limnol. Oceanogr.* **51**, 310–320.
- Langer G., Nehrke G., Thoms S. and Stoll H. (2009) Barium partitioning in coccoliths of *Emiliania huxleyi*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 2899–2906.
- Levi-Kalishman Y., Raz S., Weiner S., Addadi L. and Sagi I. (2000) X-Ray absorption spectroscopy studies on the structure of a biogenic “amorphous” calcium carbonate phase. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3977–3982.
- Liu Y.-Y., Jiang J., Gao M.-R., Yu B., Mao L.-B. and Yu S.-H. (2013) Phase Transformation of Magnesium Amorphous Calcium Carbonate (Mg-ACC) in a Binary Solution of Ethanol and Water. *Cryst. Growth Des.* **13**, 59–65.
- Lorens R. B. (1981) Sr, Cd, Mn and Co distribution coefficients in calcite as a function of calcite precipitation rate. *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 553–561.
- Loste E., Wilson R. M., Seshadri R. and Meldrum F. C. (2003) The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies. *J. Cryst. Growth* **254**, 206–218.
- Meibom A., Cuif J.-P., Houlbreque F., Mostefaoui S., Dauphin Y., Meibom K. L. and Dunbar R. (2008) Compositional variations at ultra-structure length scales in coral skeleton. *Geochim. Cosmochim. Acta* **72**, 1555–1569.
- Meldrum F. C. and Sear R. P. (2008) Now You See Them. *Science* **322**, 1802–1803.
- Merz M. U. (1992) The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies* **26**, 81–101.

- Michel F. M., MacDonald J., Feng J., Phillips B. L., Ehm L., Tarabrella C., Parise J. B. and Reeder R. J. (2008) Structural Characteristics of Synthetic Amorphous Calcium Carbonate. *Chem. Mater.* **20**, 4720–4728.
- Mucci A. and Morse J. W. (1983) The incorporation of Mg^{2+} and Sr^{2+} into calcite overgrowths: influences of growth rate and solution composition. *Geochim. Cosmochim. Acta* **47**, 217–233.
- Navrotsky A. (2004) Energetic clues to pathways to biomineralization: Precursors, clusters, and nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12096–12101.
- Payne V. E., Rickaby R. E. M., Benning L. G. and Shaw S. (2008) Calcite crystal growth orientation: implications for trace metal uptake into coccoliths. *Mineral. Mag.* **72**, 269–272.
- Pingitore Jr. N. E. and Eastman M. P. (1986) The coprecipitation of Sr^{2+} with calcite at 25°C and 1 atm. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**, 2195–2203.
- Politi Y., Metzler R. A., Abrecht M., Gilbert B., Wilt F. H., Sagi I., Addadi L., Weiner S. and Gilbert P. (2008) Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17362–17366.
- Radha A. V., Forbes T. Z., Killian C. E., Gilbert P. U. P. A. and Navrotsky A. (2010) Transformation and crystallization energetics of synthetic and biogenic amorphous calcium carbonate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 16438–16443.
- Radha A. V., Fernandez-Martinez A., Hu Y., Jun Y.-S., Waychunas G. A. and Navrotsky A. (2012) Energetic and structural studies of amorphous $\text{Ca}_{1-x}\text{Mg}_x\text{CO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($0 \leq x \leq 1$). *Geochim. Cosmochim. Acta* **90**, 83–95.
- Raiteri P. and Gale J. D. (2010) Water Is the Key to Nonclassical Nucleation of Amorphous Calcium Carbonate. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17623–17634.
- Riding R. (2012) A Hard Life for Cyanobacteria. *Science* **336**, 427–428.
- Rimstidt J. D., Balog A. and Webb J. (1998) Distribution of trace elements between carbonate minerals and aqueous solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **62**, 1851–1863.
- Rodriguez-Blanco J. D., Shaw S., Bots P., Roncal-Herrero T. and Benning L. G. (2012) The role of pH and Mg on the stability and crystallization of amorphous calcium carbonate. *J. Alloys Compd.* **536**, S477–S479.
- Sel O., Radha A. V., Dideriksen K. and Navrotsky A. (2012) Amorphous iron (II) carbonate: Crystallization energetics and comparison to other carbonate minerals related to CO_2 sequestration. *Geochim. Cosmochim. Acta* **87**, 61–68.
- Stephens C. J., Ladden S. F., Meldrum F. C. and Christenson H. K. (2010) Amorphous Calcium Carbonate is Stabilized in Confinement. *Adv. Funct. Mater.* **20**, 2108–2115.
- Tesoriero A. J. and Pankow J. F. (1996) Solid solution partitioning of Sr^{2+} , Ba^{2+} , and Cd^{2+} to calcite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 1053–1063.

Thompson J. B., Schultze-Lam S., Beveridge T. J. and Des Marais D. J. (1997) Whiting events: biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **42**, 133–141.

Verrecchia E., Freytet P., Verrecchia K. and Dumont J. (1995) Spherulites in Calcrete Laminar Crusts - Biogenic CaCO_3 Precipitation. *J. Sediment. Res. Sect. - Sediment. Petrol. Process.* **65**, 690–700.

Waditee R., Hossain G. S., Tanaka Y., Nakamura T., Shikata M., Takano J., Takabe T. and Takabe T. (2004) Isolation and Functional Characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporters from Cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* **279**, 4330–4338.

Weiner S. and Addadi L. (2011) Crystallization Pathways in Biomineralization. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41**, 21–40.

Yu X.-C. and Margolin W. (1997) Ca^{2+} -mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J.* **16**, 5455–5463.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Characterization of the solid products formed in the synthesis with stoichiometric conditions at high carbonate concentration (100 mM) with Na_2CO_3 as a carbonate source. A) Bright-field TEM image of the poorly crystalline carbonate particles. B) EDXS spectrum of the particles. Sodium and chlorine are attributed to salt precipitating upon drying. Mg, Ca, Sr and Ba are detected within the particles. C) MS coupled TGA-DSC analyses of the poorly crystalline Ca, Mg, Sr, Ba-carbonates formed at high carbonate concentration. DTG curve (full line), released CO_2 (dash line) and heat flow curve (dot line) are plotted against heating temperature. D) XRD patterns of the sample dried at room temperature immediately after the mixing of the solutions (i), after heating at 325 °C (ii), at 375 °C (iii) and sample dried one month after mixing of the solutions (iv). “h” denotes diffraction peaks attributed to halite NaCl (peaks at 32° and 47° in 2θ are attributed to the (200) and (220) planes, respectively). “c” denotes diffraction peaks attributed to calcite. Diffraction peaks at 23, 29 and 36° are attributed to the (012), (104) and (110) calcite planes respectively.

Fig. 2. Characterization of the solid products of the synthesis with stoichiometric conditions at high carbonate concentration (100 mM) and with NaHCO_3 as a carbonate source. A) EDXS spectrum of the product. Sodium and chloride result from residual salt formed upon sample drying. B) XRD pattern of the sample. “h” stands for halite diffraction peaks; “c” for calcite. The diffraction peaks at 23° , 29° and 36° are attributed to the (012), (104) and (110) calcite planes, respectively.

Fig. 3. Characterization of the solid products of the synthesis under stoichiometric conditions performed at low carbonate concentration (10 mM). A) Bright-field TEM image of the particles. B) EDXS spectrum of the particles. Sodium and chloride result from residual salt formed upon sample drying. Mg, Ca, Sr and Ba are detected within the particles. C) TGA- DSC analyses of the poorly crystalline Ca, Mg, Sr, Ba-carbonates formed at low carbonate concentration. DTG curve (full line), and heat flow curve (dot line) are plotted against heating temperature. D) XRD patterns of the sample dried at room temperature immediately after the mixing of the solutions (i), washed with milliQ water (ii) and collected one month after the precipitation (iii). “v” stands for vaterite diffraction peaks, “m” for monohydrocalcite and “c” for calcite. The diffraction peaks at 23° , 29° and 36° are attributed to the (012), (104) and (110) calcite planes, respectively.

Fig. 4. Characterization of the solid products of the synthesis performed at low carbonate concentration (10 mM) with a high magnesium concentration (10 mM). A) Bright-field TEM image of the particles. B) EDXS spectrum of the particles. Sodium and chloride result from residual salt formed upon sample drying. Mg, Ca, Sr and Ba are detected within the particles. C) TGA-DSC analyses of the poorly crystalline Ca, Mg, Sr, Ba-carbonates. DTG curve (full line), and heat flow curve (dot line) are plotted against heating temperature. D) XRD patterns of the poorly crystalline sample dried at room temperature immediately after the mixing of the solutions.

Fig. 5. Characterization of the solid products of the synthesis performed at low carbonate concentration (10 mM) without magnesium. A) SEM image of the particles. B) EDXS spectrum of the particles. Sodium and chloride result from residual salt formed upon sample drying. C) TGA-DSC analyses of the crystalline carbonates. DTG curve (full line), and heat flow curve (dot line) are plotted against heating temperature. D) XRD patterns of sample. “c” denotes diffraction peaks attributed to calcite. Diffraction peaks at 23, 29 and 36° are attributed to the (012), (104) and (110) calcite planes respectively.

Fig. 6. Characterization of the solid products of the synthesis performed at low carbonate concentration (10 mM) with a high magnesium concentration (10 mM) and without strontium. A) Bright-field TEM image of the particles. B) EDXS spectrum of the particles. Sodium and chloride result from residual salt formed upon sample drying. Mg, Ca and Ba are detected within the particles. C) TGA-DSC analyses of the poorly crystalline Ca, Mg, Ba-carbonates. DTG curve (full line), and heat flow curve (dot line) are plotted against heating temperature. D) XRD patterns of the sample dried at room temperature immediately after the mixing of the solutions (i) and collected one month after the precipitation (ii). “m” denotes diffraction peaks attributed to monohydrocalcite. Diffraction peaks at 20.5, 29 and 31.7° are attributed to the (111) and (2-11) monohydrocalcite planes for 20.5°, (112) and (2-12) for 29°, (031) and (301) for 31.7°.

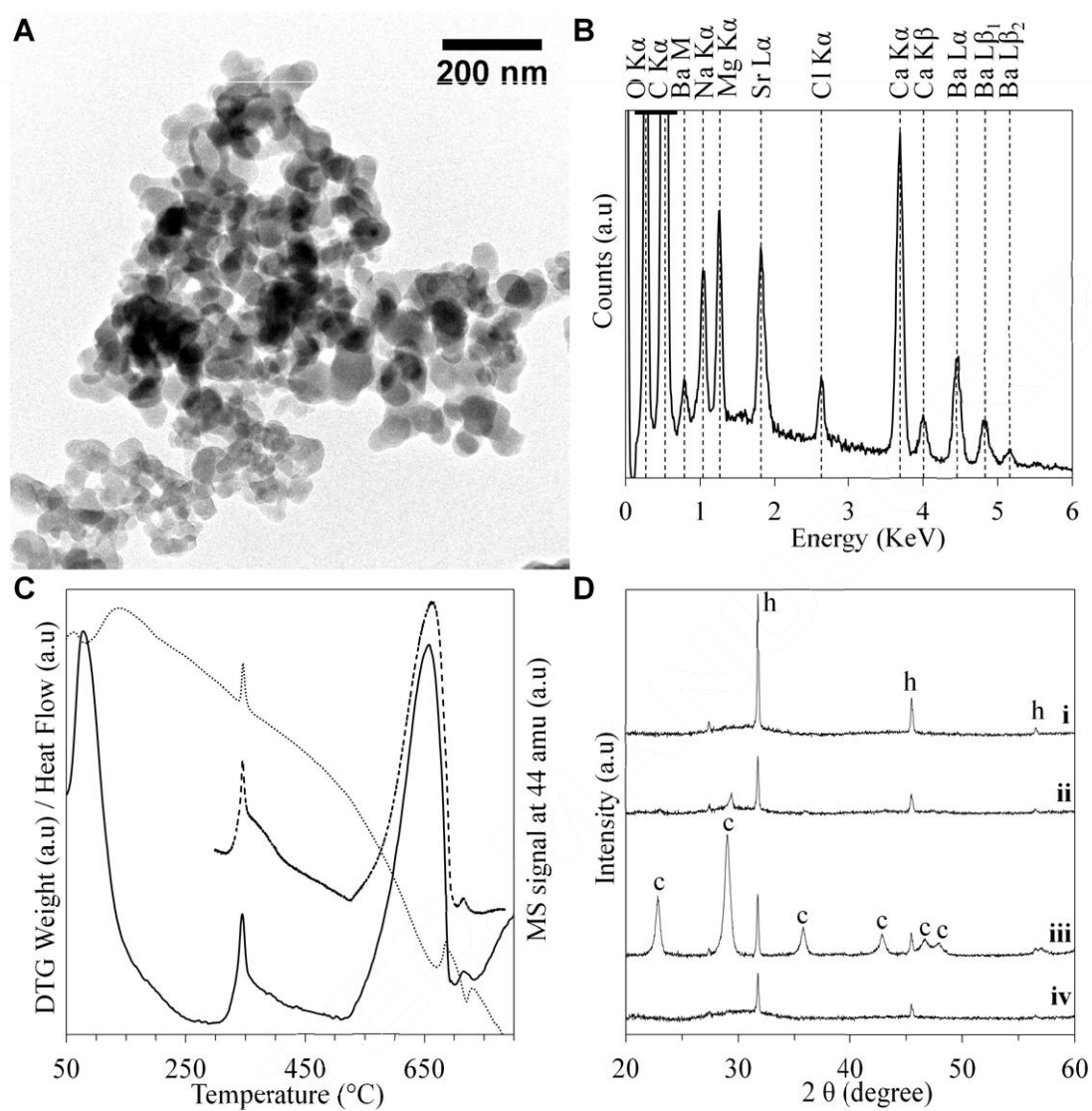
Fig. 7. Characterization of the solid products of the synthesis performed at low carbonate concentration (10 mM) with a high magnesium concentration (10 mM) and without barium. A) Bright-field TEM image of the particles. B) EDXS spectrum of the particles. Sodium and chlorine result from residual salt formed upon sample drying. Mg, Ca and Sr are detected within the particles. C) TGA-DSC analyses of the poorly crystalline Ca, Mg, Sr-carbonates. DTG curve (full line), and heat flow curve (dot line) are plotted against heating temperature. D) XRD patterns of the sample dried at room temperature immediately after the mixing of the solutions (i) and collected one month after the precipitation (ii). “m” stands for monohydrocalcite diffraction peaks and “a” for

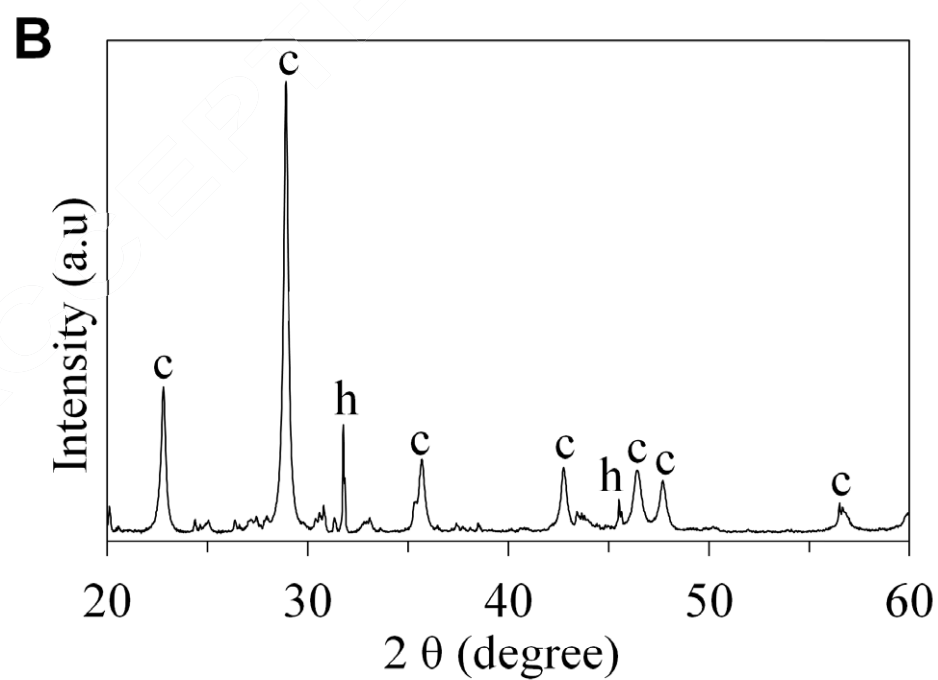
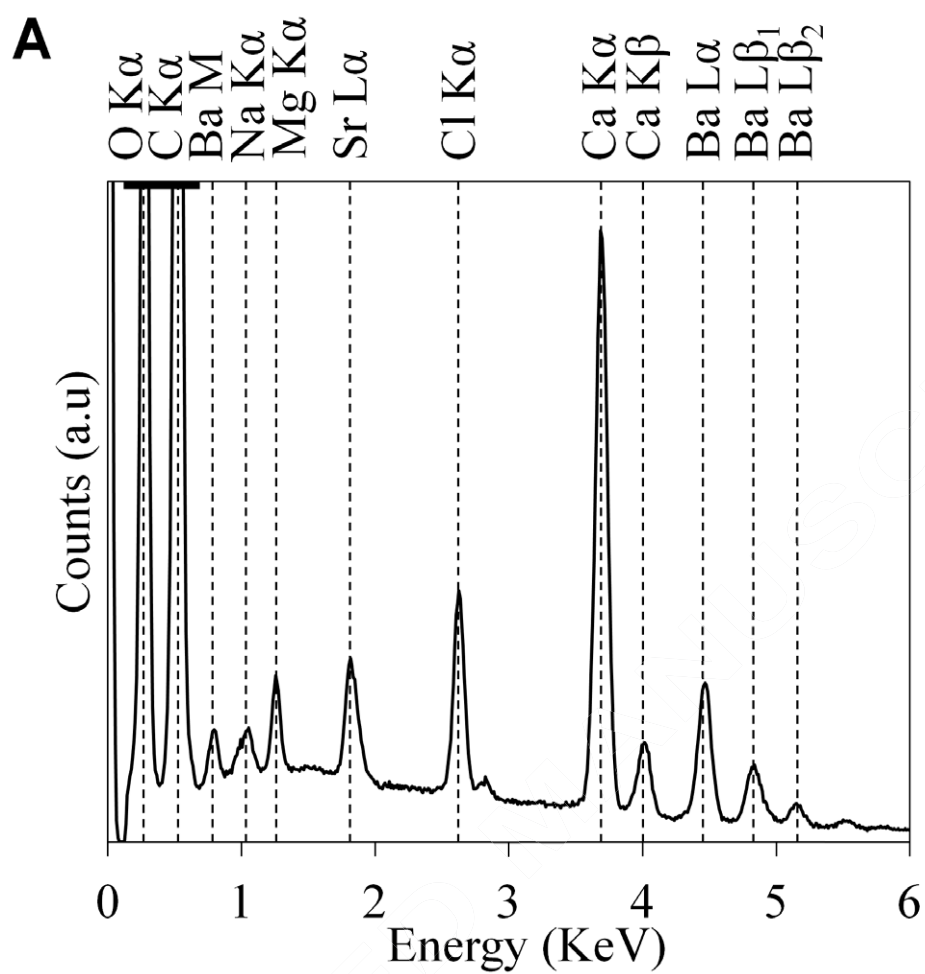
aragonite. Diffraction peaks at 20.5, 29 and 31.7° are attributed to the (111) and (2-11) monohydrocalcite planes for 20.5°, (112) and (2-12) for 29°, (031) and (301) for 31.7°. The diffraction peaks at 26 and 27° are attributed to the (111) and (021) aragonite planes, respectively.

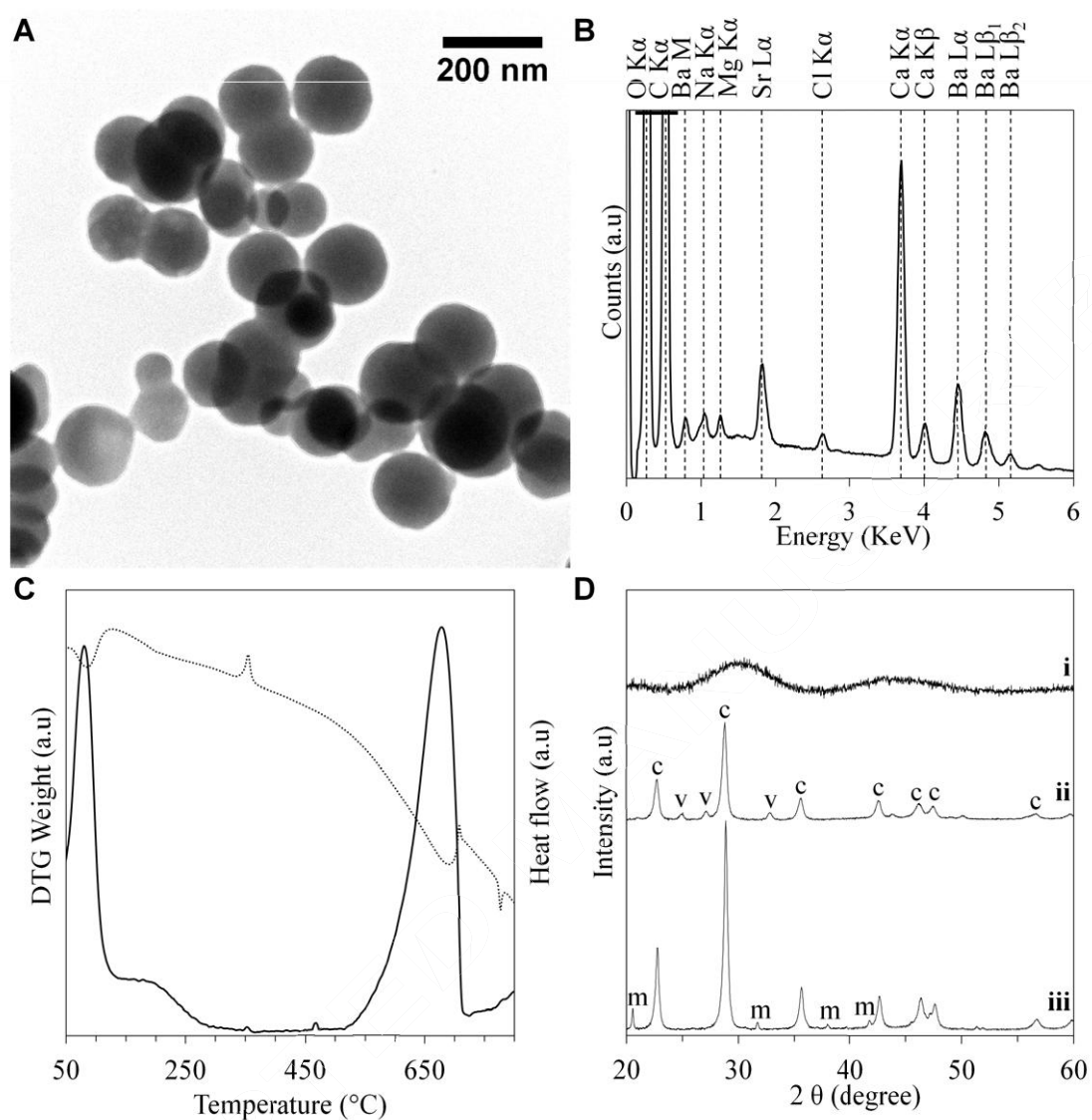
Fig. 8. Characterization of the solid products of the synthesis performed at low carbonate concentration (10 mM) with a high magnesium concentration (10 mM) and without strontium and barium. A) SEM image of the particles. B) EDXS spectrum of the particles. Sodium and chlorine result from residual salt formed upon sample drying. C) XRD patterns of the sample dried at room temperature immediately after the mixing of the solutions. “m” denotes diffraction peaks attributed to monohydrocalcite. Diffraction peaks at 20.5, 29 and 31.7° are attributed to the (111) and (2-11) monohydrocalcite planes for 20.5°, (112) and (2-12) for 29°, (031) and (301) for 31.7°.

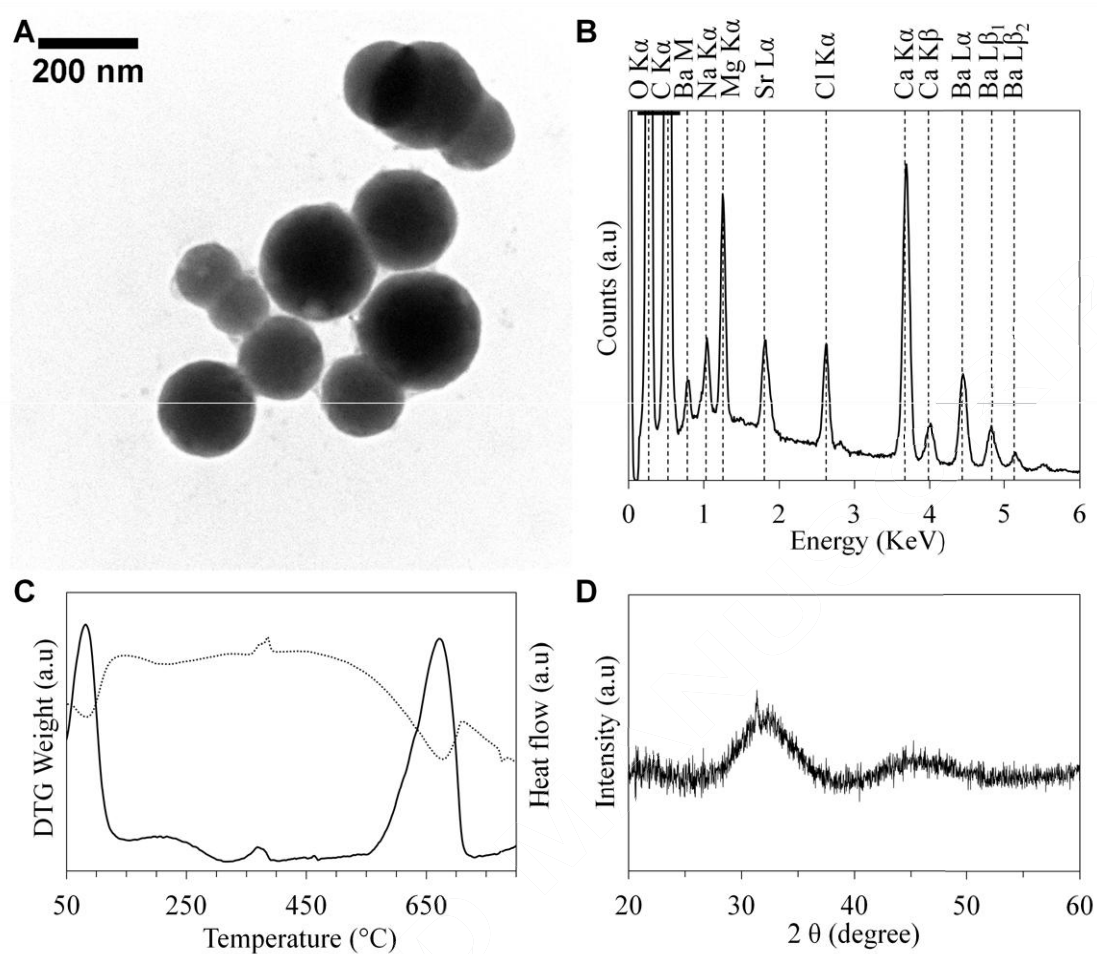
Table 1: List of performed experiments, indicating the concentrations of the different elements before precipitation and the chemical and mineralogical compositions of the resulting precipitates. All of these experiments were carried out at room temperature. The elemental ratios were determined by EDXS and the water quantity was inferred from TGA analyses. The final pH corresponds to the pH measured about 15 min after the precipitation. The saturation indices of the solutions with amorphous calcium carbonate have been calculated based on the solubility product measured by Kellermeier et al. (2014)

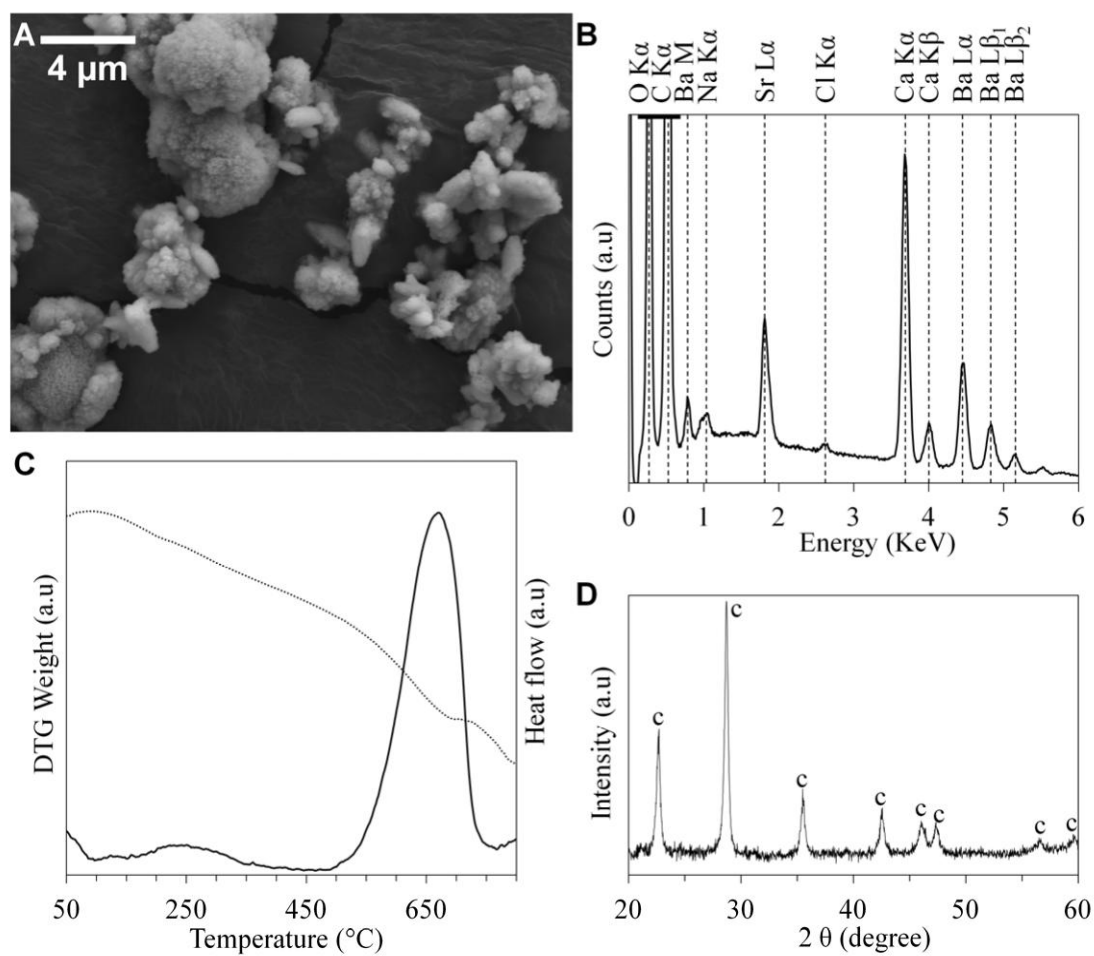
Experiments	Initial concentrations (in mM)					Saturation indices		Final pH	Mineral composition	Chemical composition
	[Mg ²⁺]	[Ca ²⁺]	[Sr ²⁺]	[Ba ²⁺]	[CO ₃ ²⁻]	Calcite	ACC			
Stoichiometric conditions at high concentrations (Fig.1)	18.5	53.1	7.7	20.8	100	3.857	3.012	10.63	Amorphous	Mg _{0.16} Ca _{0.51} Sr _{0.08} Ba _{0.25} CO ₃ ·0.86H ₂ O
Stoichiometric conditions at low concentrations (Fig.3)	1.85	5.31	0.77	2.08	10	2.758	1.913	11.02	Amorphous	Mg _{0.04} Ca _{0.61} Sr _{0.06} Ba _{0.29} CO ₃ ·0.84H ₂ O
Higher Mg concentration (Fig.4)	10	5.31	0.77	2.08	10	2.648	1.803	10.64	Amorphous	Mg _{0.16} Ca _{0.51} Sr _{0.05} Ba _{0.28} CO ₃ ·1.03H ₂ O
Without Mg (Fig.5)	0	5.31	0.77	2.08	10	2.783	1.938	10.88	Calcite	Ca _{0.59} Sr _{0.07} Ba _{0.34} CO ₃
Without Sr (Fig.6)	10	5.31	0	2.08	10	2.657	1.812	10.57	Amorphous	Mg _{0.16} Ca _{0.56} Ba _{0.28} CO ₃ ·0.93H ₂ O
Without Ba (Fig.7)	10	5.31	0.77	0	10	2.669	1.824	10.64	Amorphous	Mg _{0.25} Ca _{0.67} Sr _{0.08} CO ₃ ·0.88H ₂ O
Without Sr and Ba (Fig.8)	10	5.31	0	0	10	2.678	1.833	10.68	Monohydrocalcite	(Mg _{0.26} Ca _{0.74})CO ₃ ·1.6H ₂ O

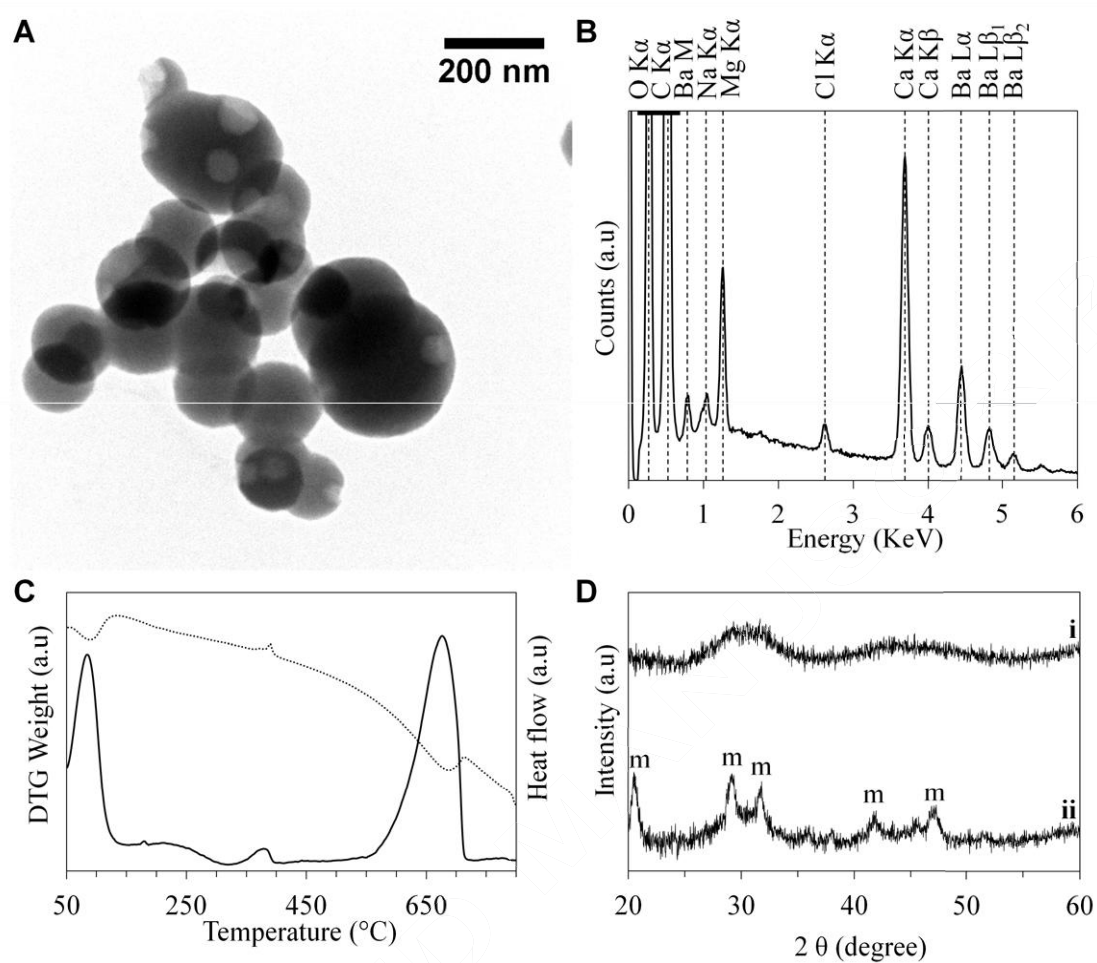


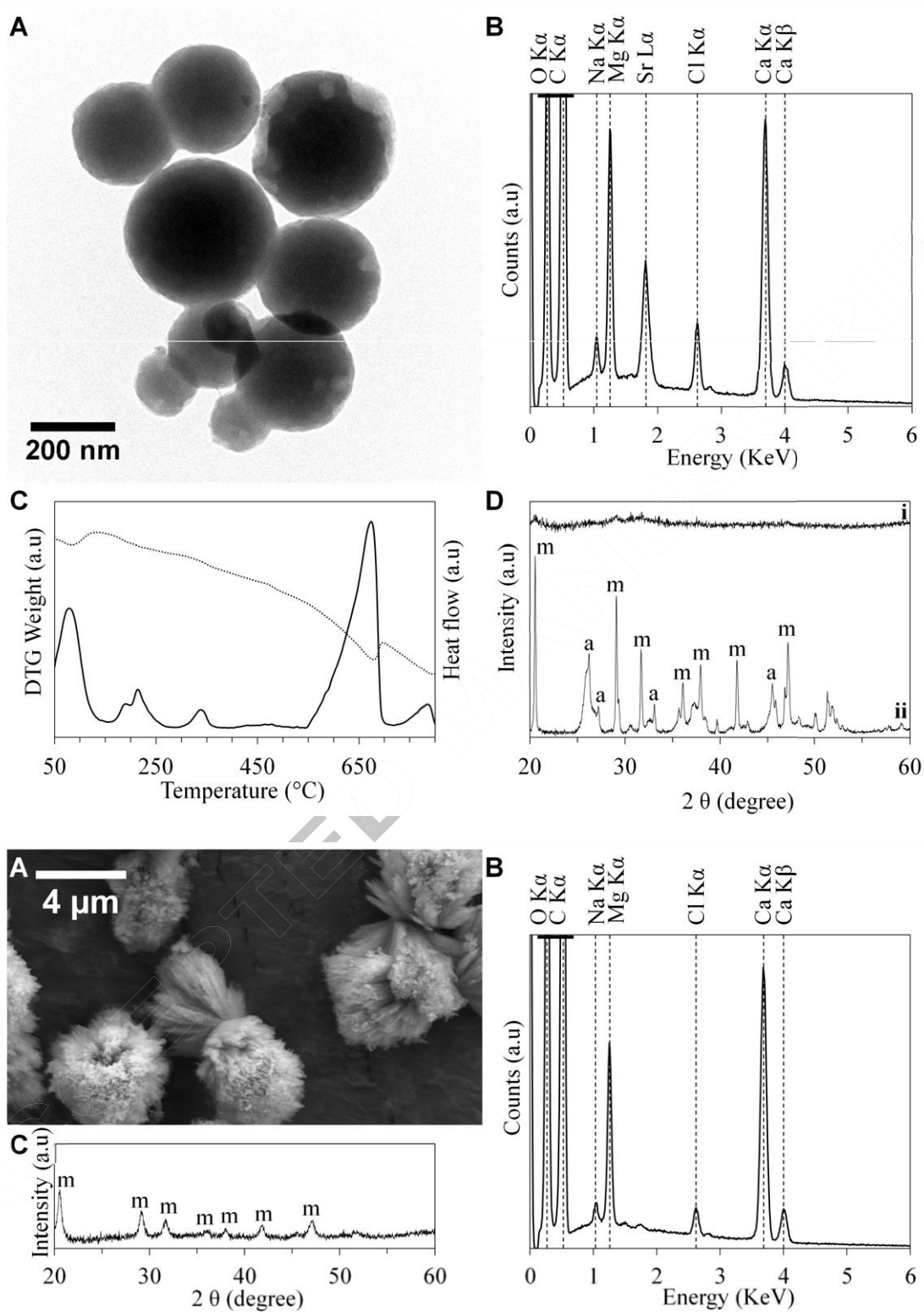












3. Études complémentaires non incluses dans l'article

3.1. Évolution thermique de la cristallinité des particules synthétisées par les cyanobactéries

Il a été proposé que la formation intracellulaire de carbonates par les cyanobactéries pouvait être un processus déjà présent chez des cyanobactéries anciennes ayant vécu possiblement il y a 2 à 2,5 milliards d'années (Benzerara et al., 2014). Des traces, interprétées comme des fossiles de cellules cyanobactériennes mais ne formant pas spécialement de carbonates intracellulaires ont été observées dans l'enregistrement géologique (e.g., Tomitani et al., 2006). Par conséquent, se pose la question de la préservation potentielle des inclusions intracellulaires dans les cyanobactéries au cours d'un vieillissement. En effet, la plupart des biominéraux sont modifiés notamment par les conditions de pression et de température auxquelles ils sont soumis au cours du vieillissement. Afin de mimer la fossilisation d'un biominéral ou de la matière organique, il est possible de soumettre au laboratoire ces objets à une élévation de pression et température (Li et al., 2014). Par ailleurs, des études de spectroscopie des rayons X ont montré que les amorphes de carbonate de calcium ont différentes structures locales possibles (Gebauer et al., 2010; Fernandez-Martinez et al., 2013). Ce « polymorphisme » suggère une similarité des structures locales des amorphes à celles des phases cristallines anhydres connues du carbonate de calcium. Cependant le chauffage rapide jusqu'à 350 °C de carbonates de calcium de type « proto-calcite » et de type « proto-vatérite » fait cristalliser ces amorphes, dans les deux cas, en calcite. On a pu voir dans l'article publié à *Geochimica et Cosmochimica Acta* (§ 2) que les carbonates que nous avons synthétisés cristallisent en calcite vers 350 °C à pression ambiante avec un chauffage lent (5 °C/min).

Pour tester la stabilité des phases formées par les cyanobactéries, nous avons donc tenté de chauffer des cellules lyophilisées et de les analyser en même temps par DRX. Une des différences majeures avec les carbonates abiotiques est la présence de matière organique associée aux cellules ainsi que de polyphosphates que les cyanobactéries forment également dans leur milieu intracellulaire. En outre, même si les carbonates intracellulaires ont une structure locale différente de celle des carbonates synthétiques, nous ne savons pas s'ils cristallisent aussi en calcite et à la même température.

La souche *Cyanothece* sp. PCC 7425 est cultivée dans du milieu BG-11 à 30 °C et sous lumière continue. Après 6 mois, la culture est centrifugée et lyophilisée pour obtenir une poudre de cellules. Cette poudre est placée dans le montage de DRX in situ. Une observation en STEM est faite avant la lyophilisation (Figure 1.1).

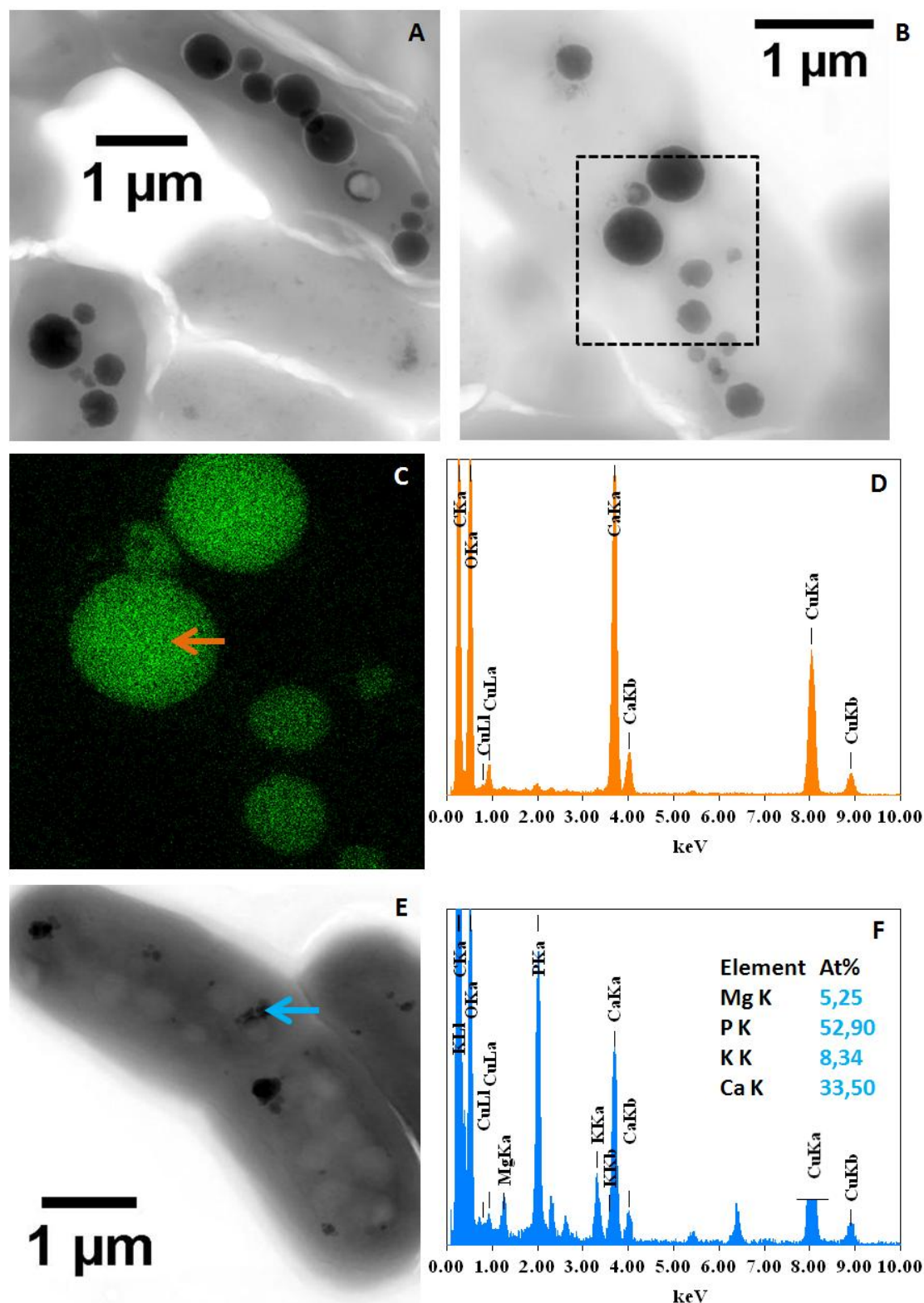


Figure 1.1 : Culture de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 dans du BG-11 sous lumière continue à 30 °C. (A) et (B) Images STEM en champ clair de cellules contenant des carbonates de calcium. (C) Cartographie EDXS du calcium. (D) Spectre EDXS de la particule pointée par la flèche orange. (E) Image STEM en champ clair. (F) Spectre EDXS de la particule pointée par la flèche bleue.

On peut voir sur les observations faites en microscopie Figure 1.1 que les cyanobactéries contiennent des carbonates de calcium. Il n'y a ni strontium ni baryum car les cellules ont été cultivées dans du BG-11 qui ne contient pas ces éléments (cf. Chapitre 2). Il y a dans certaines cellules des particules riches en phosphore. Ce sont des polyphosphates et ils contiennent du calcium et un peu de magnésium et du potassium (cf. Chapitre 2, § 2.1.2).

Les cellules sont ensuite lyophilisées puis analysées en DRX pendant qu'elles sont chauffées. Un premier palier est appliqué à 300 °C pour acquérir un diffractogramme puis d'autres tous les 50 °C jusqu'à 900 °C. Les diffractogrammes sont présentés en Figure 1.2 (noter que le support en alumine donne un ensemble de pics fins à 26, 35, 38, 43, 53, 58, 67 et 68° (en 2 theta)).

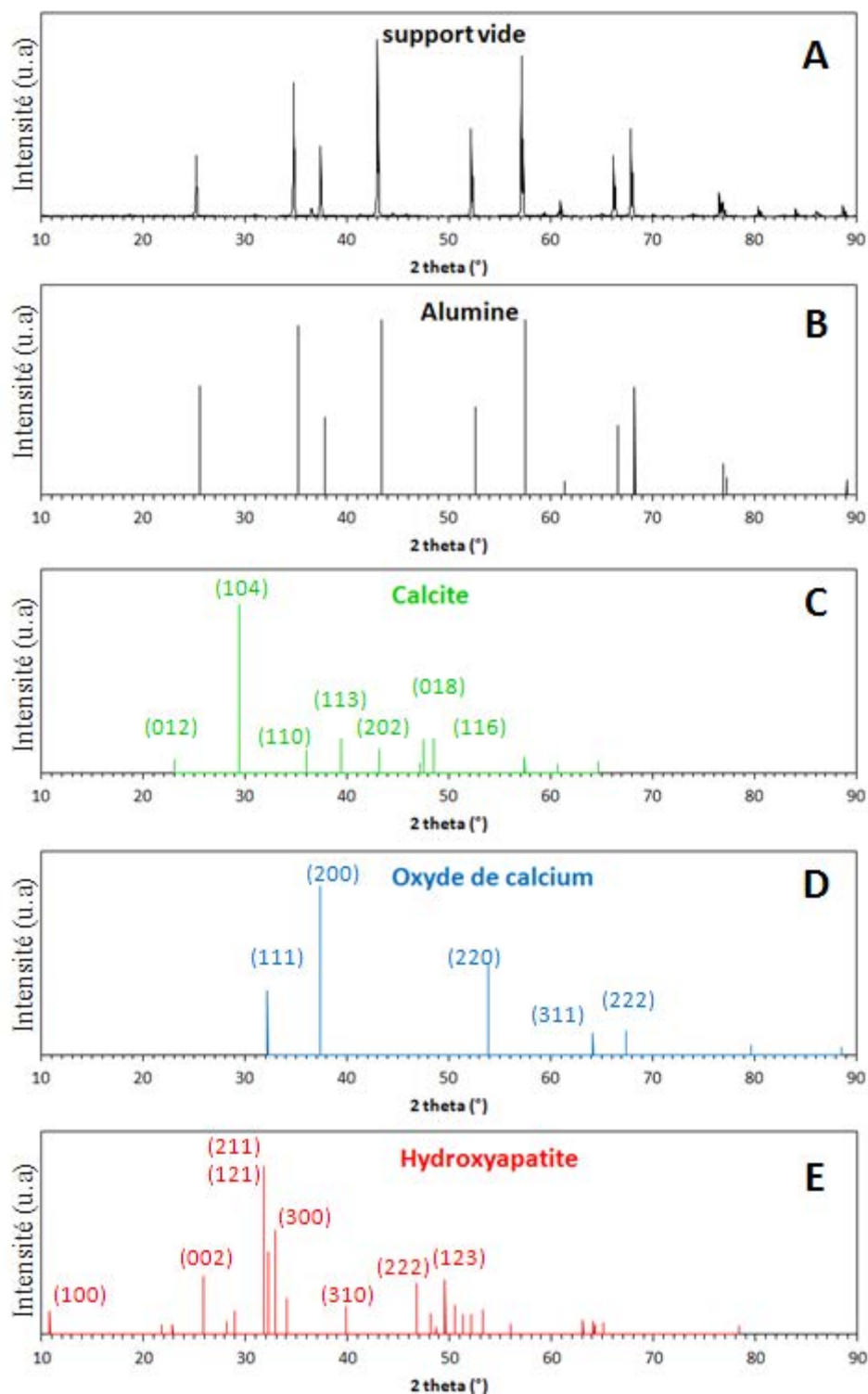


Figure 1.2 : Diffractogrammes de références. (A) Support en alumine. (B) Alumine. (C) Calcite. (D) Oxyde de calcium. (E) Hydroxyapatite.

Les diffractogrammes effectués pendant le chauffage des cellules montrent des changements et l'apparition de nouvelles phases cristallines. Les résultats sont présentés en Figure 1.3.

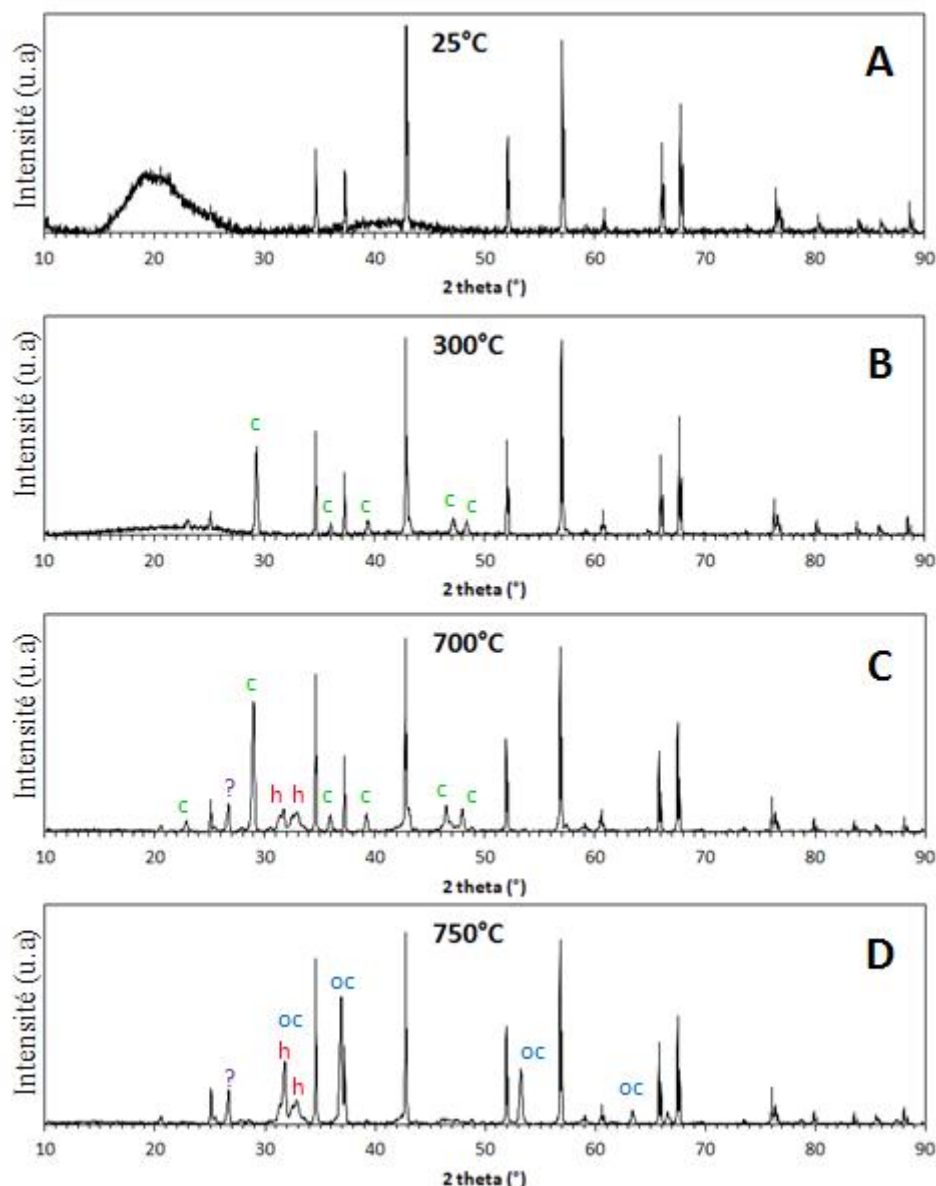


Figure 1.3 : Culture de *Cyanothecce* sp. PCC 7425 déshydratée, chauffée et analysée en DRX. (A) Diffractogramme à 25 °C. (B) à 300 °C. (C) à 700 °C. (D) à 750 °C. c : calcite, h : hydroxylapatite; oc : oxyde de calcium; ? : pics non identifiés. Les pics non indexés correspondent au support d'alumine.

Le diffractogramme à température ambiante (25 °C) présente deux "bosses" (vers 20° et 42°) correspondant à la diffusion des rayons X par les cellules. Ces bosses ont en partie disparu à 300 °C, ce qui doit correspondre à la dégradation d'une partie de la matière organique (Marcilla et al., 2009). On voit aussi à la même température l'apparition de pics de diffraction que l'on peut attribuer à de la calcite. Les carbonates ont donc cristallisé à 300 °C dans les conditions que nous avons utilisées. À partir de 300 °C et jusqu'à 700 °C, on voit apparaître d'autres phases moins abondantes. Certains pics correspondent à de l'hydroxyapatite. Un pic vers 26,5° (2 θ) ne correspond à aucun carbonate ni phosphate de calcium.

À 750 °C, les pics de la calcite ont laissé place à ceux de l'oxyde de calcium. D'après les analyses faites en ATG, les carbonates de calcium subissent une décarbonatation vers 650 °C. Nous observons donc cette transformation à des températures plus élevées dans le montage RX que par ATG.

Les cellules de PCC 7425 cultivées dans BG-11 contiennent initialement des carbonates amorphes mais aussi des polyphosphates. Ces polyphosphates contenaient du calcium ($\text{Ca/P} = 0,63$) d'après l'EDXS faite avant la lyophilisation (Figure 1.1). L'hydroxyapatite contient en général plus de calcium que de phosphore ($\text{Ca/P} \sim 1,67$). La montée en température a pu entraîner par dissolution/précipitation un mélange du calcium et des phosphates de ces deux types d'inclusions intracellulaires (carbonates de calcium et polyphosphates) et ensuite la formation d'hydroxyapatite.

Cette expérience montre qu'il est possible de caractériser les transformations thermiques des carbonates intracellulaires. Dans l'article publié à GCA, nous avons montré que les carbonates amorphes synthétiques cristallisaient vers 350 °C en calcite puis se transformaient en oxyde de calcium vers 650 °C pendant que du CO_2 était libéré (cf. article § 2). Ces transformations sont retrouvées en chauffant les cyanobactéries pour des températures différentes. La cristallisation en calcite s'effectue avant 300 °C et la décarbonatation de celle-ci entre 700 et 750 °C.

Nous sommes conscients que la fossilisation, telle qu'elle a lieu dans l'environnement, ne consiste pas simplement en une élévation de température. De nombreux autres processus induisant dissolution, re-précipitation, mélange avec des fluides de différentes compositions, peuvent affecter de manière complexe l'évolution d'une cellule jusqu'à sa fossilisation dans l'enregistrement géologique. Néanmoins, il a été plusieurs fois proposé qu'une montée en température pouvait simuler le vieillissement, car il est connu en cinétique que l'élévation de température cause une augmentation des vitesses de réaction selon la loi d'Arrhenius (e.g., Gourier et al., 2004) même si les fluides environnant ou les biominéraux peuvent modifier le résultat (e.g., Seewald, 2001 ; Li et al., 2014). Ici, une élévation de température sur des cyanobactéries formant des carbonates de calcium amorphes intracellulaires semble conduire à la formation de calcite dans un premier temps, posant la question de la forme sous laquelle les fossiles de ces bactéries pourraient être retrouvés dans l'enregistrement géologique dans le cas où elles auraient été préservées de manière exceptionnelle.

4. Conclusion

Nous avons vu que les précipités de carbonate abiotiques synthétiques pouvaient avoir les mêmes caractéristiques (taille, morphologie, composition et faible cristallinité) que les particules observées dans *Gloeomargarita lithophora* C7. Les rapports entre le calcium, le strontium et le baryum dans les précipités abiotiques formés sont les mêmes que ceux introduits dans les solutions de précipitation. Ainsi, la précipitation de carbonates amorphes n'induit par elle-même aucun fractionnement notable de ces éléments. Ce qui signifie que les rapports Sr/Ca et Ba/Ca dans la solution environnant les carbonates intracellulaires des cyanobactéries sont à peu près égaux à ceux que l'on peut mesurer dans ces mêmes carbonates intracellulaires. Autrement dit, si les carbonates intracellulaires contiennent beaucoup plus de strontium et de baryum relativement au calcium que le milieu ambiant, c'est que les cyanobactéries concentrent ces éléments par rapport au calcium dans leur cytoplasme. Les compositions particulières observées sont un effet caractéristique de la biominéralisation, dues à une activité biologique aboutissant à une forte surconcentration de ces éléments dans la cellule. Entre autres conséquences, l'observation éventuelle de carbonates sphériques submicrométriques très enrichis en strontium et/ou en baryum (relativement par rapport au calcium) par rapport au milieu environnant peut constituer une signature de micro-organismes concentrant ces éléments.

Les carbonates amorphes synthétiques ont été formés à un pH d'environ 10, pour des concentrations en cations (Mg, Ca, Sr ou Ba) et en carbone inorganique proches de 10 mM. Le milieu intracellulaire (ou au moins l'éventuel compartiment intracellulaire dans lequel se forment les inclusions) est forcément saturé ou sursaturé par rapport aux carbonates de calcium amorphes dans les différentes souches de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires. Pourtant, ce que l'on sait sur le milieu intracellulaire des cyanobactéries en général est très différent.

Le calcium est régulé à de basses concentrations dans beaucoup de cellules, qu'elles soient eucaryotes (Campbell, 2014) ou procaryotes (Rosen, 1987). Chez les bactéries, il a été montré que le calcium « libre » (c'est-à-dire non complexé) peut servir de signal sous forme de pulses de concentration et c'est pourquoi il est souvent maintenu à de faibles concentrations (Dominguez, 2004). Par exemple Barrán-Berdón et al. (2011) ont mesuré une concentration en calcium libre de 0,1 μM dans la souche *Anabaena* sp. PCC 7120. Cette espèce ne forme pas de carbonates intracellulaires (Benzerara et al., 2014). Barrán-Berdón et al. (2011) ont exposé ces cellules à des polluants environnementaux et ont mesuré une augmentation de la concentration en calcium jusqu'à 2,6 μM pendant quelques secondes. Cette concentration est malgré tout de 3 ordres de grandeur en dessous des concentrations utilisées par dans les synthèses abiotiques.

Les cyanobactéries concentrent le carbone inorganique sous forme de HCO_3^- et CO_2 pour optimiser l'efficacité de la photosynthèse (Price et al., 2002). Badger et Andrews (1982) ont mesuré une concentration du carbone inorganique total de 30 mM dans la souche *Synechococcus* sp. Nageli RPIMP N1. Cette concentration est comparable avec celle utilisée dans les synthèses abiotiques.

Plusieurs études ont mesuré le pH intracellulaire de cyanobactéries. Par exemple, Belkin et Boussiba (1991) ont mesuré dans *Arthrospira platensis*, un pH entre 6,8 et 7,9. Jiang et al. (2013), ont mesuré un pH entre 6,9 et 7,5 dans la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803. Notons que ces deux espèces de cyanobactéries ne forment pas de carbonate intracellulaire (Benzerara et al., 2014). Le pH est proche de la neutralité dans la plupart des cellules vivantes mais il est possible qu'un compartiment intracellulaire puisse avoir un pH très différent.

En prenant les valeurs maximales intracellulaires suggérées par ces études, le cytosol est largement sous-saturé pour la phase de carbonate de calcium amorphe (indice de saturation de -2,225). Pour les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires, au moins l'un de ces trois paramètres est donc différent de ce que l'on connaît dans les autres bactéries. Nous n'avons pas pu au cours de ma thèse progresser sur une détermination plus précise de ces paramètres (pH, concentrations en calcium et en carbone inorganique) dans les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires. Cela reste une des perspectives fondamentales sur laquelle il faudra progresser à l'avenir. Dans le chapitre suivant, en revanche, nous présenterons des études visant à déterminer quelles conditions environnementales sont propices ou non à la formation de carbonates intracellulaires par ces cyanobactéries.

5. Perspectives

5.1. Détermination des limites de stabilité des carbonates amorphes

Nous avons déterminé des conditions qui permettent de produire des carbonates similaires à ceux observés dans les cyanobactéries. Pour cela le magnésium est nécessaire et le strontium ou le baryum peuvent contribuer. D'autres synthèses, en variant leurs concentrations respectives, donneront les bornes des conditions minimales pour permettre la précipitation de ces carbonates amorphes. De plus, varier le pH initial et/ou la quantité de carbone inorganique dissous donnera d'autres limites. Ainsi nous pourrions définir des intervalles de conditions de précipitation, ces intervalles devraient correspondre à la composition du milieu intracellulaire permettant la formation de carbonates amorphes.

D'autre part, plusieurs études montrent que des biomolécules agissent sur la précipitation de carbonates de calcium, notamment sur la stabilisation de la phase amorphe (Bentov et al., 2010). Dans notre étude nous n'avons pas étudié l'effet de biomolécules. La synthèse de carbonates similaires aux carbonates intracellulaires est peut-être possible dans des conditions moins éloignées du milieu intracellulaire des cyanobactéries lorsque des acides aminés ou des sucres interagissent avec le processus de précipitation. On ne connaît pas encore la chimie du milieu intracellulaire des cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires et il reste de gros efforts à fournir dans ce but. Les études actuelles sur les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires n'ont jusqu'ici pas visé à déterminer les molécules spécifiques associées aux carbonates. La possibilité d'extraire les inclusions de carbonate des cellules, de les séparer des cellules puis d'extraire les éventuelles molécules organiques plus ou moins spécifiquement associées sera clé dans ce travail.

5.2. Analyses thermogravimétriques sur des culots cellulaires

Les analyses thermogravimétriques réalisées sur les carbonates abiotiques ont permis de déterminer leur pourcentage massique d'eau (cf. article § 2). La perte de masse a montré plusieurs étapes de perte de CO₂ que l'on a corrélées aux carbonates associés aux différents cations (magnésium vers 350 °C et calcium vers 600 °C). Le même type d'analyse a été fait sur des culots bactériens. Les résultats sont en cours d'analyse. On distingue plusieurs étapes impliquant une perte de masse mais pour l'instant nous n'avons pas réussi à séparer les phénomènes de combustion de la matière organique de la décomposition des carbonates. Si l'on arrive à découpler les pertes de masse associées à la matière organique de celles associées aux carbonates, nous serons alors en mesure de déterminer le pourcentage massique que représentent les carbonates par rapport au poids sec d'une population entière. Comme évoqué précédemment, une possibilité serait de réussir à extraire en les préservant les carbonates des cellules et de s'affranchir ainsi

de l'énorme quantité de carbone organique contenue dans les cellules. Il faudra pour cela mettre au point une procédure efficace de lyse des cellules dans une solution n'entraînant pas la dissolution des carbonates; puis être capable de séparer les carbonates des fragments cellulaires. Une idée est d'associer une lyse mécanique des cellules avec un solvant organique anhydre qui permet de conserver les carbonates amorphes.

5.3. Analyses de Pair Distribution Function (PDF) des carbonates amorphes synthétiques abiotiques

L'analyse et les calculs de PDF sur les carbonates synthétiques ont été réalisés par Benoît Baptiste, ingénieur de recherche à l'IMPMC, et sont en cours d'analyse. Cette analyse est utilisée pour la caractérisation de l'ordre local dans les composés à partir de données de diffraction aux grands angles (WAXS, Fayek and El-Sayed, 2003). Quelques mg de carbonate amorphe synthétique ($\text{Mg}_{0,16}\text{Ca}_{0,53}\text{Sr}_{0,07}\text{Ba}_{0,25}\text{CO}_3 \cdot 1,03\text{H}_2\text{O}$; protocole de synthèse dans l'article § 2) sont analysés en diffraction des rayons x sur diffractomètre Panalytical Empyrean ($\theta-\theta$) équipé d'une anode en argent, en géométrie Debye Scherrer (transmission) sur un échantillon placé dans un capillaire en borosilicate de 1 mm de diamètre. Avec cette configuration, une acquisition jusqu'à $2\theta = 148^\circ$ à la longueur d'onde de l'argent ($\text{Ag K}\alpha = 0.56 \text{ \AA}$ ou 22.16 keV) permet d'atteindre un $Q_{\text{max}} = 21.8 \text{ \AA}^{-1}$.

Pour minimiser le bruit statistique aux grandes valeurs de Q lié aux faibles valeurs des facteurs de diffusion aux grands angles, le temps d'acquisition utilisé pour la plage angulaire $2^\circ < 2\theta < 50^\circ$ (25s par pas de 0.2°) est doublé pour la plage $50^\circ < 2\theta < 90^\circ$ et quadruplé pour la gamme $90^\circ < 2\theta < 148^\circ$. Un capillaire vide est mesuré dans les mêmes conditions puis son signal est soustrait de l'acquisition faite sur le composé.

Le signal de diffraction est présenté en Figure 1.4-A ; ensuite le signal est corrigé par un polynôme déterminé de façon empirique ($S(Q)$). La fonction $F(Q)$ est très bruitée au niveau des grands Q (petits rayons interatomiques) ; cela montre la limite de précision de l'analyse des distances interatomiques par diffraction des rayons x sur une source de laboratoire. Enfin une transformée de Fourier permet d'obtenir la fonction de distribution des distances interatomique $G(r)$ (Figure 1.4-D). La fonction $G(r)$ issue de cette analyse donne accès à l'ensemble des distances interatomiques r dans un composé indépendamment de sa cristallinité. Elle peut être utilisée pour l'étude du désordre dans les cristaux mais elle est aussi particulièrement adaptée aux matériaux amorphes ou aux nanoparticules.

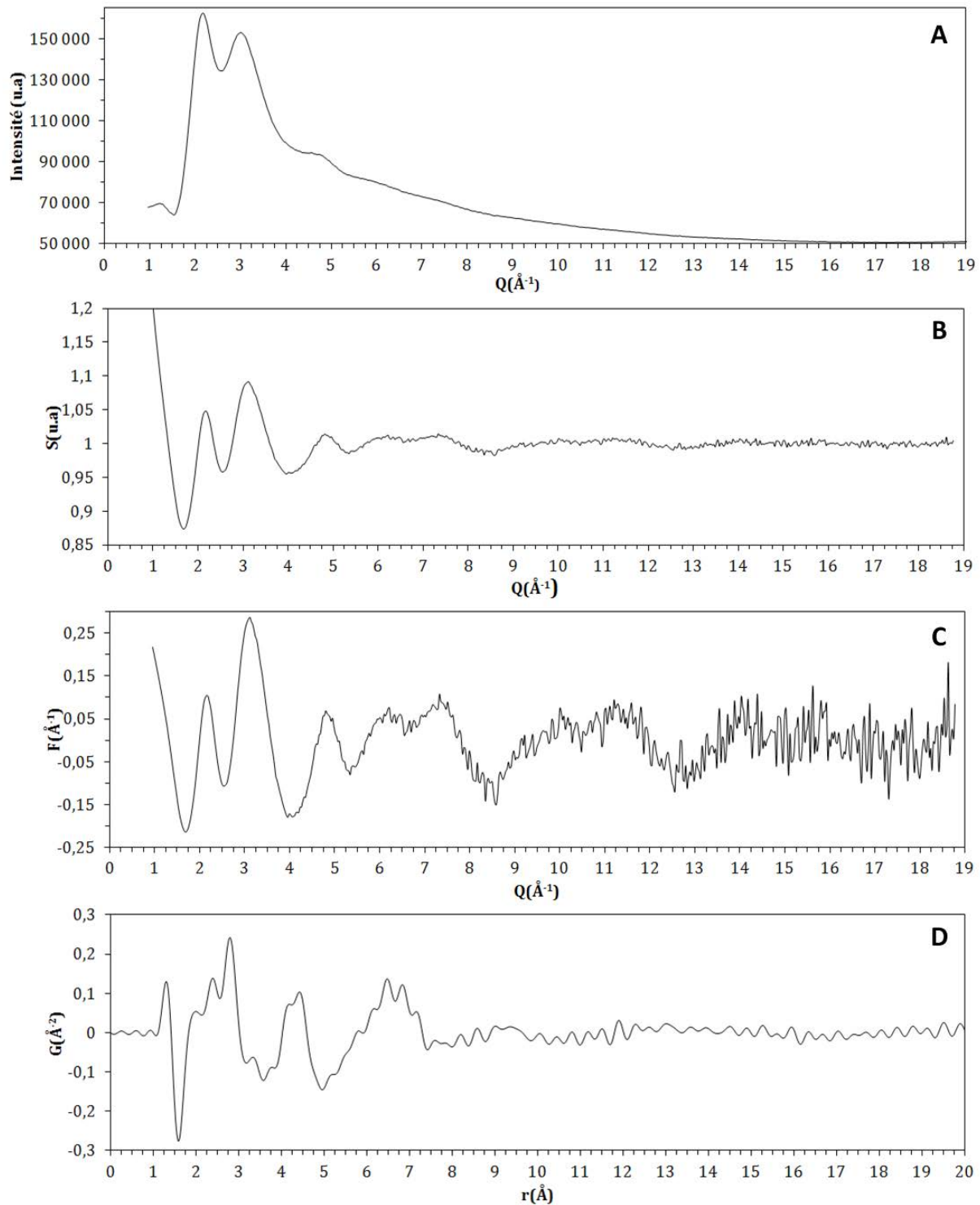


Figure 1.4 : Analyses PDF de carbonates amorphes synthétiques $\text{Mg}_{0,16}\text{Ca}_{0,53}\text{Sr}_{0,07}\text{Ba}_{0,25}\text{CO}_3 \cdot 1,03\text{H}_2\text{O}$. (A) : $I(Q)$. (B) : $S(Q)$. (C) : $F(Q)$. (D) : $G(r)$.

Des $G(r)$ simulés pour les mêmes conditions de mesure de différents carbonates sont comparés au $G(r)$ obtenu (Figure 1.5). Nous pouvons donc attribuer des distances à des couples d'atomes.

La distance de 1,32 Å correspond à la liaison C-O. Cette distance est plus grande que dans les autres carbonates.

Les distances de 2,4 et 2,8 Å sont attribuées respectivement aux liaisons Ca-O et Ba-O. La distance Ca-O est proche de celle de la monohydrocalcite, une phase hydratée (comme l'amorphe) de carbonate de calcium. Cette distance est plus grande que celle observée dans la barytocalcite (carbonate de calcium et de baryum). La distance Ba-O est similaire à celle dans la structure de la witherite (carbonate de baryum) mais plus petite que celle dans la barytocalcite. La distance correspondante à la liaison Sr-O n'est pas visible, la quantité de strontium dans le carbonate amorphe synthétique est trop faible.

Les autres distances que l'on peut distinguer sont 4,2 Å et 4,4 Å. Ces distances correspondent à deux cations reliés entre eux par un atome d'oxygène ou une liaison O-C-O pour la plupart des carbonates. La valeur 4,2 Å pourrait alternativement correspondre à celle entre deux atomes de strontium dans la strontianite et aussi à la distance Ba-Ca dans la barytocalcite. Néanmoins la quantité de strontium dans le carbonate amorphe synthétique n'est pas très élevée, l'attribution à la distance Ba-Ca est donc plus probable. La valeur 4,4 Å correspond à la distance entre deux atomes de baryum dans la witherite, nous pouvons donc penser que cette distance corresponde à la même chose dans le carbonate synthétique. Aucune des distances mesurées pour le carbonate amorphe n'est compatible avec une distance dans la structure de la magnésite (MgCO_3).

La fonction de distribution de l'amorphe n'est superposable avec aucune fonction calculée avec des carbonates de structures connues. Cependant on peut distinguer des similitudes avec la monohydrocalcite, la witherite et la barytocalcite. Il est possible que cette fonction de distribution puisse être modélisée avec un mélange de différents carbonates. Ou bien il faudrait partir d'une structure déjà connue et simuler un mélange de différents cations. Ou bien peut-être qu'il faut les deux, c'est-à-dire plusieurs structures avec des mélanges de cations dans chacune d'entre elles. Pour répondre, des affinements de type Rietveld sont en cours.

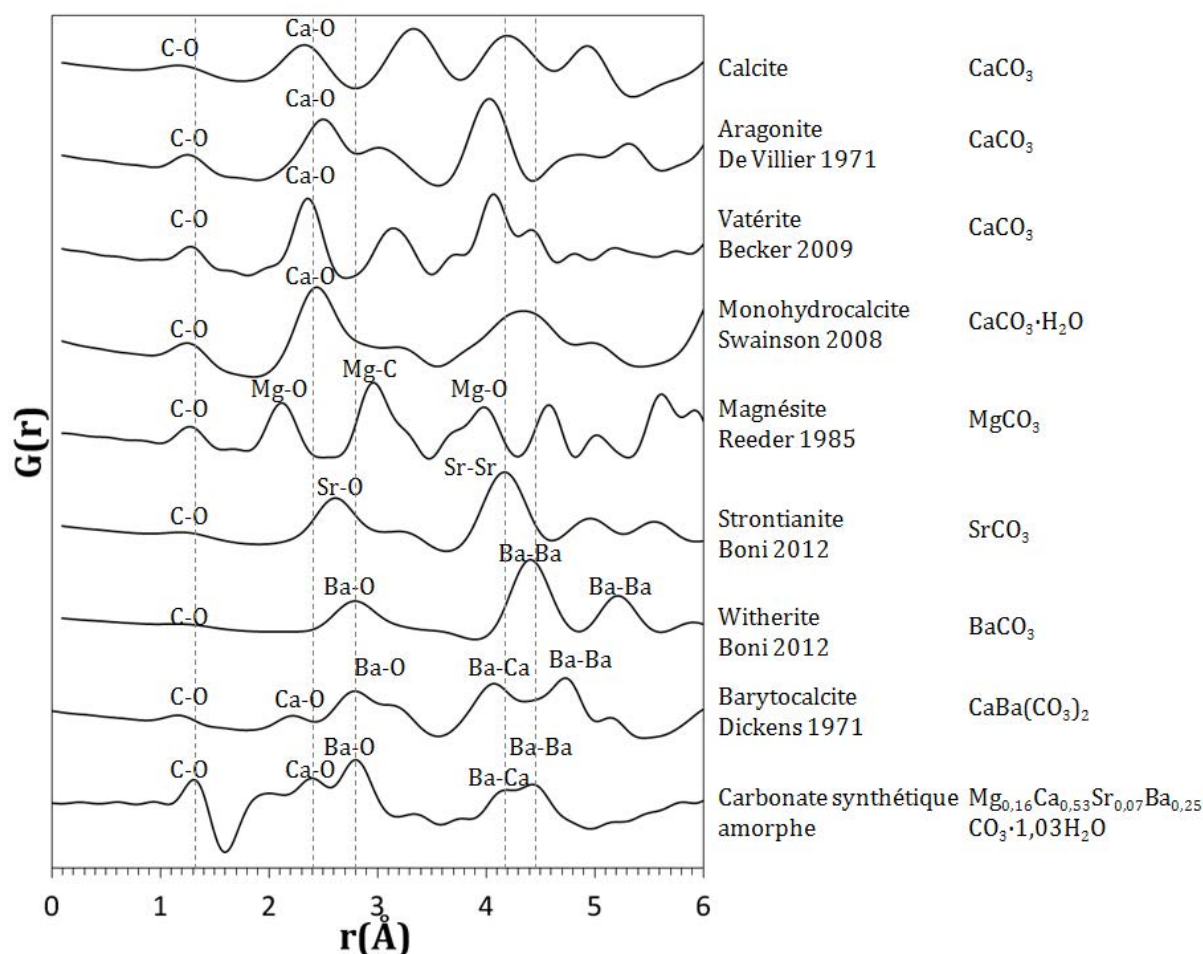


Figure 1.5 : $G(r)$ de carbonates de référence et celui d'un carbonate synthétique amorphe de Mg, Ca, Sr, Ba. Les références sont simulées pour les mêmes paramètres que la mesure du carbonate amorphe. La composition du carbonate synthétique est $\text{Mg}_{0,16}\text{Ca}_{0,53}\text{Sr}_{0,07}\text{Ba}_{0,25}\text{CO}_3 \cdot 1,03\text{H}_2\text{O}$; cette composition est prise en compte pour traiter l'absorption des éléments. Les distances du carbonate synthétique sont attribuées par identification sur les références. La strontianite et la witherite utilisées ne sont pas pures, leurs formules sont respectivement $(\text{Sr}_{0,853}\text{Ca}_{0,147})\text{CO}_3$ et $(\text{Ba}_{0,981}\text{Sr}_{0,019})\text{CO}_3$.

L'idée ensuite serait de modéliser le signal pour évaluer la ressemblance de structures proches avec des phases cristallines connues d'une part et de comparer les résultats avec des carbonates formés par des cyanobactéries d'autre part.

L'étude sur des cellules permettra de faire ressortir le signal de ces carbonates et donc de déterminer la structure locale des carbonates intracellulaires. Les différences et les points communs avec les carbonates abiotiques peuvent permettre d'en apprendre plus sur les conditions de formation et donc sur le milieu intracellulaires de ces bactéries. En comprenant comment les conditions de synthèse influent sur la structure locale des carbonates de calcium amorphes et en comparant à des carbonates biologiques, nous pourrions affiner les conditions de précipitation intracellulaires.

La caractérisation par Pair Distribution Function des carbonates biologiques peut aussi informer sur les différences potentielles dans la structure locale des atomes des carbonates intracellulaires. Plusieurs souches peuvent former des carbonates intracellulaires et deux phénotypes semblent apparaître en fonction de la localisation des inclusions dans la cellule. Il est possible que ces phénotypes présentent des carbonates de structure locale différente. La structure locale des carbonates intracellulaires peut aussi changer en fonction des conditions du milieu de culture et de l'état physiologique des cellules. Des études de PDF pourraient permettre de voir de telles différences potentielles entre les carbonates et de comprendre, par comparaison avec des carbonates synthétiques, à quelles conditions de synthèse correspondent ces différences.

Pour ces expériences, il serait une fois de plus utile de purifier les carbonates intracellulaires. En fait, quelques mg de carbonates purs sont nécessaires pour l'obtention de la PDF. Prenons par exemple la souche C7. Si les cellules contiennent en moyenne $0,05 \mu\text{m}^3$ de carbonate chacune, cela représente $1,09 \cdot 10^{-10}$ mg de $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ par cellule. Pour avoir 1 mg de carbonate, il faudra donc 61,6 mL d'une culture de DO 1. De telles cultures sont envisageables ; néanmoins l'extraction de la totalité des carbonates n'a, pour le moment, pas été réalisée.

Chapitre 2 : Étude cinétique de la précipitation de carbonates de calcium intracellulaires par des cyanobactéries

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que pour que les cyanobactéries puissent former des carbonates intracellulaires amorphes, il faut qu'au moins l'un des paramètres chimiques contrôlant la précipitation de ces phases (pH, activité de Ca^{2+} , activité des ions carbonate) soit différent de ceux que l'on pense généralement prévaloir dans le cytoplasme des cyanobactéries. Ou au moins que cela se déroule dans un volume confiné comme par exemple des vésicules, dont la composition chimique serait régulée. Pour avancer sur ce point, il faudra à l'avenir pouvoir définir ces paramètres chimiques à l'échelle adaptée dans ces cellules. Cependant, ici, nous avons suivi une voie différente et avons entrepris plutôt de mieux comprendre comment les conditions environnementales extracellulaires pouvaient ou non influencer le processus de biominéralisation intracellulaire des carbonates. Plus particulièrement, nous nous sommes posé les questions suivantes :

- 1) Y-a-t-il une sursaturation minimum du milieu extracellulaire permettant la formation de carbonates amorphes intracellulaires ? Si c'est le cas, il est possible d'imaginer que ces cyanobactéries peuvent se développer sans former de carbonates intracellulaires dans certaines conditions faiblement sursaturées. A contrario, peut-on imaginer que ces cyanobactéries sont capables de former des carbonates hors équilibre apparent, c'est-à-dire dans un milieu extracellulaire sous-saturé ?
- 2) Quelles quantités de calcium et de carbone représentent les carbonates intracellulaires des cyanobactéries ? Les observations en microscopie électronique montrent de manière frappante les carbonates intracellulaires car ceux-ci ont un fort contraste mais il est important de mieux évaluer ce que ce carbone stocké par les cellules peut représenter par rapport à toute la quantité de carbone organique formé par la photosynthèse.
- 3) Dans quelles proportions les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires influencent-elles leur milieu environnant ? On sait que les cyanobactéries ont tendance à favoriser la précipitation de carbonates extracellulaires notamment en augmentant le pH extracellulaire. La précipitation intracellulaire de carbonates pourrait avoir pour conséquence de diminuer cet effet ?

- 4) Les carbonates de calcium intracellulaires peuvent-ils être remobilisés, redissous et si oui, dans quelles conditions ? Ceci est particulièrement important si l'on veut d'une part évaluer la possibilité que les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires utilisent ces carbonates comme réservoir de carbone inorganique. Cette question est aussi particulièrement intéressante si l'on s'intéresse à la probabilité que ces inclusions soient préservées après la mort des microorganismes et du coup à leur potentiel de fossilisation.
- 5) Y-a-t-il des différences dans la cinétique de précipitation des carbonates entre les différentes espèces de cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires ? Nous ne savons pas si les différentes espèces forment les carbonates intracellulaires selon un même mécanisme. L'évaluation de différentes cinétiques pourrait donner des pistes de réponse à cette question. Les différentes espèces poussent à différentes températures et on peut se demander si fondamentalement cela induit des cinétiques de précipitation différentes.

Pour répondre à ces questions, des souches de plusieurs espèces de cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires ont été cultivées dans un milieu synthétique contrôlé dont différents paramètres physico-chimiques (pH, concentrations de différents éléments) ont été mesurés au cours du temps par colorimétrie et ICP-AES. L'idée à la base était la suivante : suivre l'évolution du calcium en solution permettrait de remonter à la quantité de calcium fixée par les cellules et une grande partie de ce calcium fixé par les cellules serait stocké dans les inclusions carbonatées. La discussion de cette hypothèse est donc un enjeu supplémentaire de cette partie. Pour cela, nous avons aussi complété ces analyses de chimie des solutions par des observations en microscopie électronique en transmission

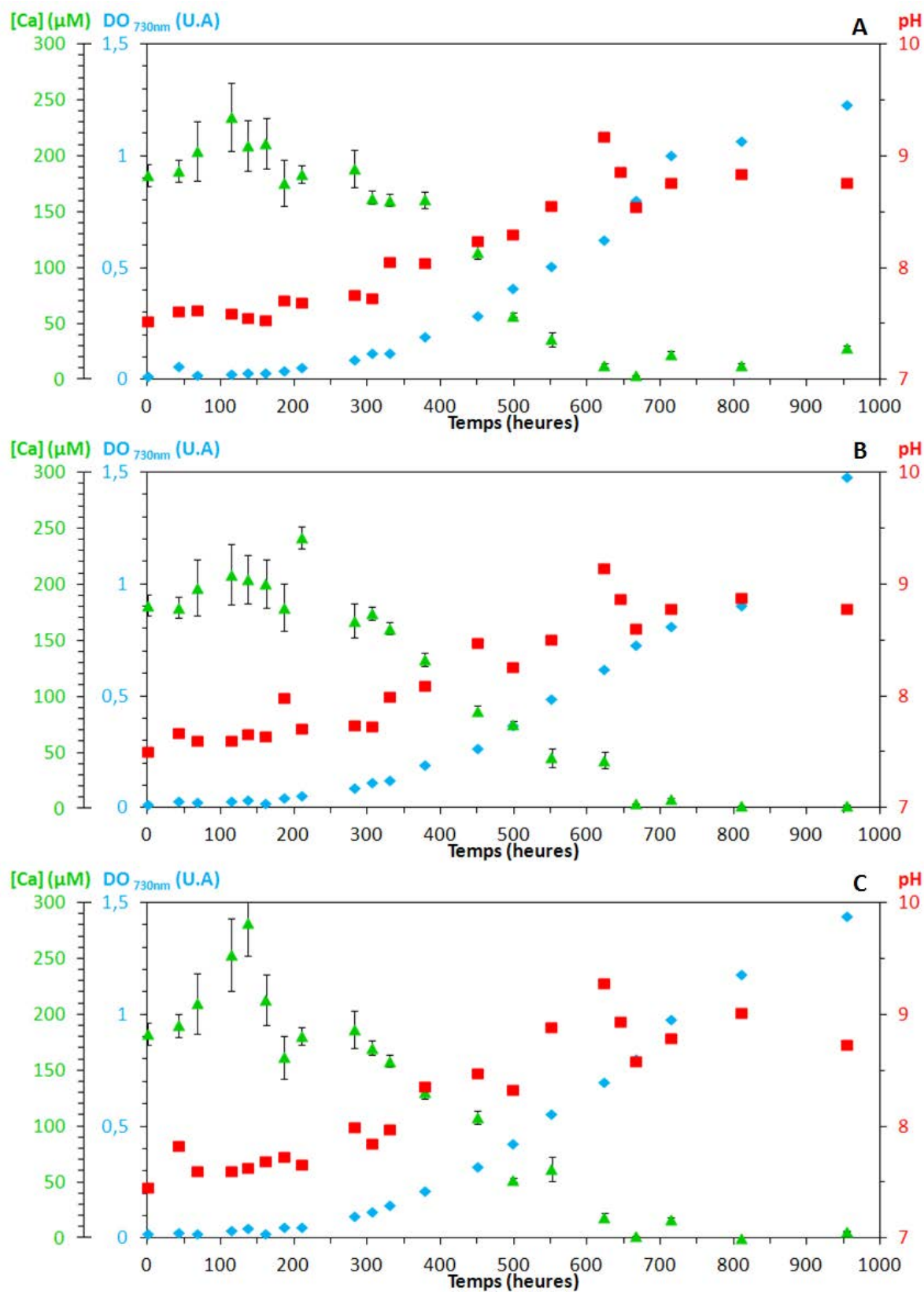
2. Résultats

La croissance bactérienne a été suivie dans le milieu BG-11 (Matériel et Méthodes § 1.3). La densité optique (DO) de la culture qui est reliée à la densité cellulaire (Matériel et Méthodes, § 1.2), le pH du milieu ainsi que la concentration en calcium (cf. Matériel et Méthodes, § 1.4 et § 2.1.1) sont mesurés. Sur certaines cultures des souches C7, PCC 7425, BP-1 et PCC 7942 (cette dernière ne forme pas de carbonates intracellulaires), l'alcalinité, les concentrations des espèces phosphatées et azotées notamment et des principaux ions ont été suivies aussi en fonction du temps permettant de réaliser des calculs de spéciation chimique et des sursaturations du milieu par rapport à différentes phases minérales. Des cultures de PPC 73106 (cyanobactérie ne formant pas de carbonate) et de PCC 6312 (formant des carbonates aux extrémités de la cellule ; annexe 2) sont également suivies.

2.1. Cinétique d'incorporation du calcium par la souche *Gloeomargarita lithophora* C7

2.1.1. Étude des données macroscopiques des cultures

Des cultures de la souche *G. lithophora* C7 ont été réalisées. À deux reprises, trois réplicats sont incubés dans du milieu BG-11 à 30 °C sous lumière continue (5-10 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$). Trois réplicats sont inoculés au 1/26^e (2 mL + 50 mL de BG-11 ; Figure 2.1, A-C) et trois autres au 1/51^e (1 mL + 50 mL de BG-11 ; Figure 2.1, D-F). Des prélèvements sont faits tous les jours. La Figure 2.1 présente le suivi de la densité optique, du pH et de la concentration en calcium en solution (fraction <0,2 μm) dans les milieux de culture au cours du temps.



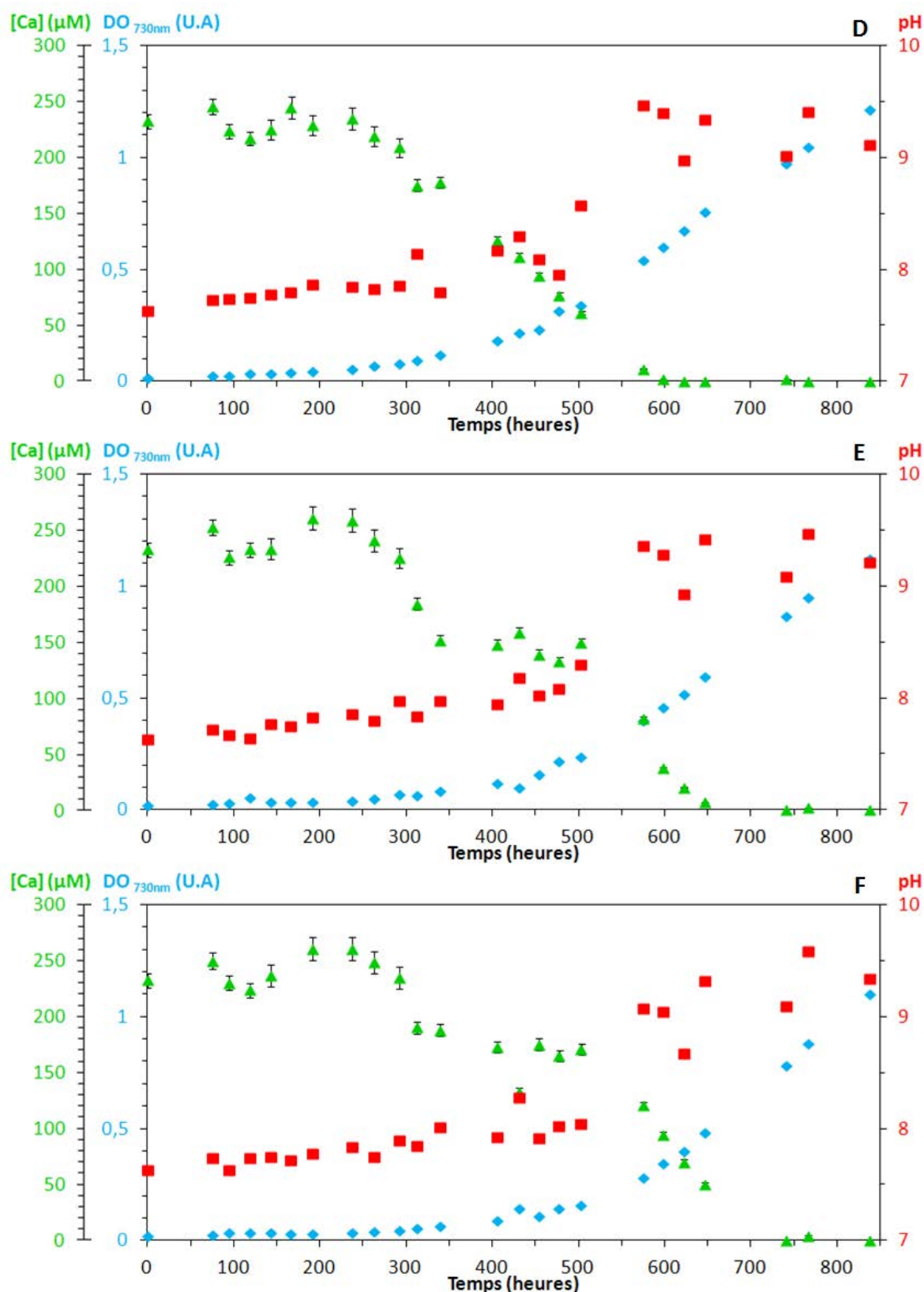


Figure 2.1 : Cultures de *Gloeomargarita lithophora* C7 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 30 °C. DO, pH et concentration en calcium mesurée par colorimétrie dans le milieu. Les graphiques A, B et C correspondent à 3 réplicats. Les graphiques D, E et F correspondent à 3 autres réplicats réalisés à une autre date. Les erreurs liées aux mesures du pH et de la DO sont constantes (0,1 pour le pH et 0,005 pour la DO).

Les six cultures montrent des évolutions similaires (Figure 2.1). Le pH augmente lentement depuis la valeur initiale du BG-11 (~7,6) jusqu'à un plateau situé entre 8,5 et 9,5. Le début de ce plateau pour le pH coïncide à peu près avec la fin de la diminution de la concentration en calcium. Dans ces conditions, la totalité du calcium a disparu de la solution en 380 h en moyenne (sans considérer la phase de latence). Les concentrations en calcium passent sous la limite de quantification de la mesure par colorimétrie qui est de 20 μM (cf. Matériel et Méthodes, § 2.1.2). La DO, quant à elle, continue d'augmenter quand il n'y a plus de calcium. Au début de certaines cultures, durant la phase de latence puis au début de la phase exponentielle, la concentration en calcium semble augmenter et diminuer de manière non monotone avant de commencer sa phase de décroissance caractéristique. Ce « bruit » vient de la mesure par colorimétrie qui nécessite d'être étalonnée à chaque série de mesure. La concentration étant mesurée le jour même, l'étalonnage est différent pour chaque jour. De plus, nous avons pu voir une dérive de la mesure donnée par le spectromètre au cours du temps. Ces divergences entraînent un bruit plus important pour les grandes valeurs de concentrations.

Des mesures complémentaires de la composition du milieu sont faites à certains temps dans 3 des 6 cultures (celles inoculées au 1/26^e). L'ICP-AES permet de quantifier avec un meilleur seuil de détection le calcium (Figure 2.2) et d'autres cations majeurs. La colorimétrie en flux continu permet de déterminer les concentrations en phosphore (Figure 2.2), et espèces azotées NH_3 et NH_4^+ . La chromatographie ionique donne les concentrations en ions fluorures, nitrites, nitrates et sulfates. Les anions comme les fluorures, les chlorures ainsi que les sulfates sont mesurés par chromatographie ionique. L'alcalinité est mesurée par colorimétrie (cf. Matériel et Méthodes, § 2.1.3-§ 2.1.5). L'alcalinité peut être exprimée ainsi :

$$\text{Alcalinité} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{HPO}_4^{2-}] + 2[\text{PO}_4^{3-}] + [\text{H}_3\text{SiO}_4^-] + [\text{NH}_3] + [\text{OH}^-]$$

Le pH et les mesures en colorimétrie en flux continu permettent de déterminer les différentes concentrations et par soustraction on obtient les valeurs de $[\text{HCO}_3^-]$ et $[\text{CO}_3^{2-}]$ (Figure 2.2).

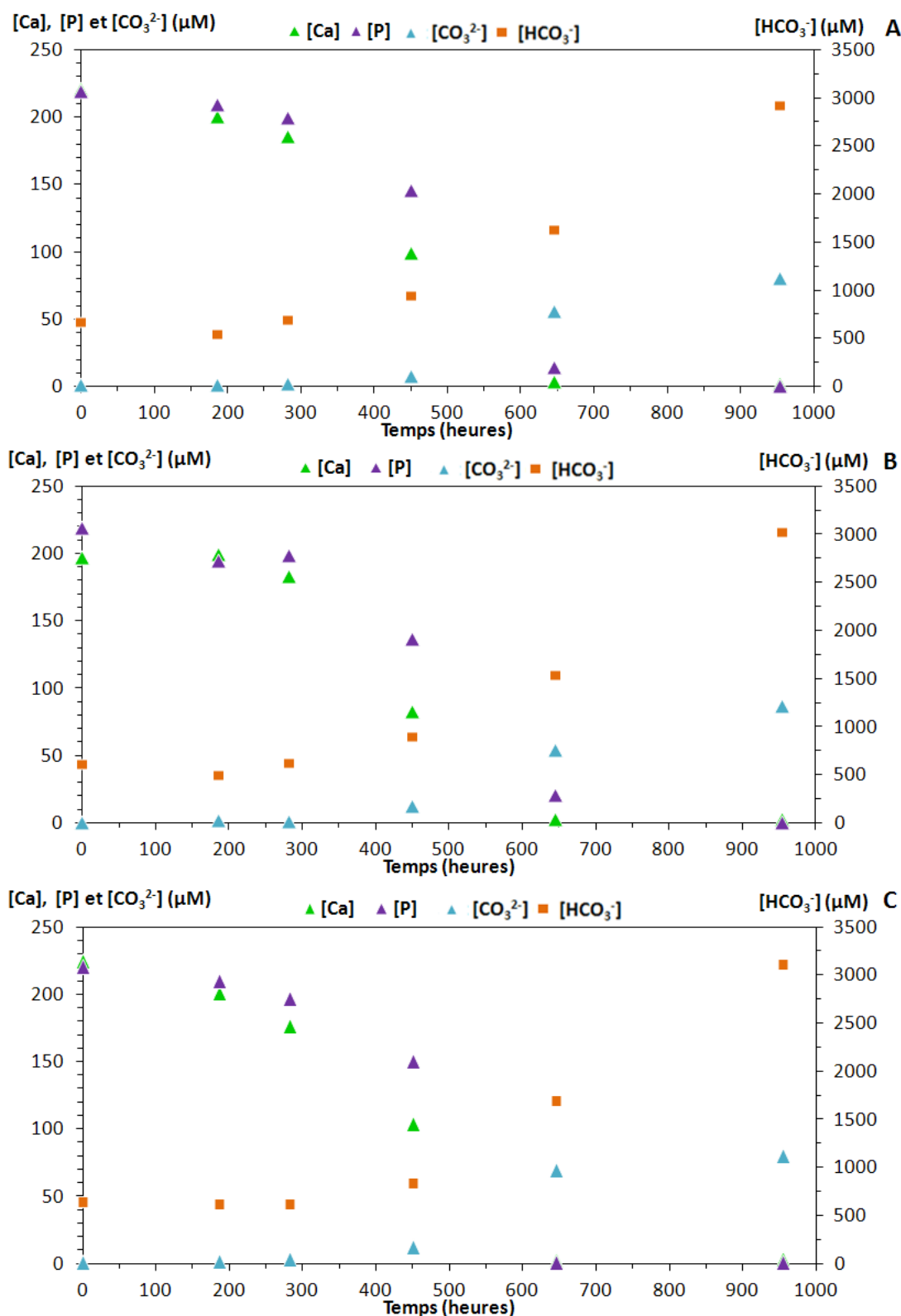


Figure 2.2 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans du BG-11. Concentrations en calcium, phosphore, hydrogénocarbonate et carbonate dans le milieu de culture. Le Ca est mesuré par ICP-AES, le P par colorimétrie en flux continu le HCO_3^- et le CO_3^{2-} sont calculées à l'aide des mesures d'alcalinité, du pH et des autres éléments contribuant à l'alcalinité. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats. Dans les 3 cultures à $t = 950$ h, les valeurs de Ca et de P sont respectivement inférieures à $4 \mu\text{M}$ et $1 \mu\text{M}$.

La Figure 2.2 montre les concentrations en phosphore total, calcium, ion bicarbonates et carbonates dans le milieu de culture pendant la croissance bactérienne. Le seuil de quantification de l'ICP-AES (ici $0,15 \mu\text{M}$ pour le calcium) permet de déterminer la concentration finale de calcium dans la solution. La concentration en calcium restante à la fin des cultures est de $2,75 \pm 0,54 \mu\text{M}$. La concentration en phosphore diminue presque aussi rapidement que celle de calcium. La concentration d'ions bicarbonates, quant à elle, augmente jusqu'à environ 3 mM . L'augmentation des concentrations en HCO_3^- et du CO_3^{2-} vient de la solubilisation du CO_2 atmosphérique qui augmente avec le pH. La Figure 2.3 présente l'évolution calculée par le logiciel de spéciation Visual MINTEQ des concentrations en HCO_3^- et en CO_3^{2-} dans le BG-11 en fonction du pH en considérant l'équilibre avec une pression partielle en CO_2 atmosphérique constante de $0,00038 \text{ atm}$ sans tenir compte de la précipitation possible de carbonate de calcium. Ces calculs indiquent les quantités de carbone inorganique que l'on peut dissoudre dans le BG-11 en fonction du pH. Si les concentrations réelles dans nos cultures correspondent au modèle alors le carbone inorganique est contrôlé par le CO_2 atmosphérique. Si ce n'est pas le cas, il y a peut-être une activité biologique qui diminue ou augmente la quantité de carbone inorganique dans le milieu de culture et/ou il n'y a pas d'équilibre avec l'atmosphère. Au début des cultures, les concentrations mesurées de HCO_3^- augmentent lentement de 500 à $750 \mu\text{M}$ de façon concomitante avec le pH entre $7,6$ et 8 ($377 \mu\text{M}$ ont été introduites dans la préparation du milieu BG-11). Cette concentration correspond bien aux concentrations calculées selon le modèle à pH $7,75$ et 8 . En revanche, vers $t = 650 \text{ h}$ la concentration mesurée dans les cultures est de $1\,500 \mu\text{M}$, le pH est de 9 et la concentration calculée pour ce pH dans le BG-11 est de $6\,500 \mu\text{M}$. Les quantités de carbone inorganique sont inférieures aux quantités maximales : le piégeage du carbone par les cellules est peut-être responsable de cela. À $t = 950 \text{ h}$, le pH est d'environ $8,75$ et la concentration mesurée en HCO_3^- dans les cultures d'environ $3\,000 \mu\text{M}$ alors que la concentration calculée pour ce pH est de $3\,600 \mu\text{M}$. La concentration dans la solution est proche de celle calculée.

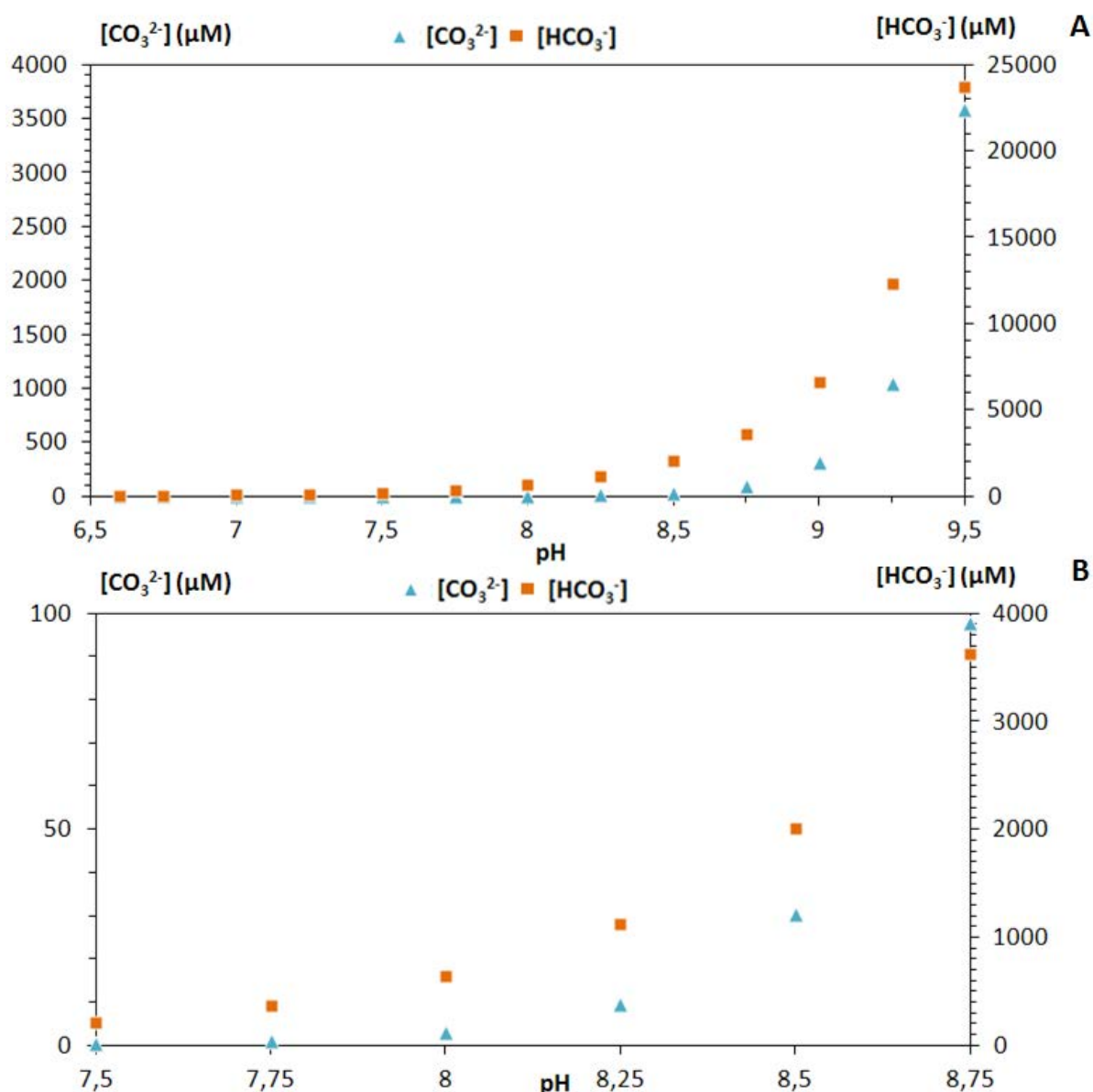


Figure 2.3 : Concentration calculées en carbonates et hydrogénocarbonates dans le milieu BG-11 en fonction du pH. (A) Concentrations entre pH 6,5 et 9,5. (B) entre pH 7,5 et 8,75.

Il est possible de calculer, via le logiciel de spéciation chimique Visual MINTEQ et à partir des mesures réalisées (pH, concentrations et température de l'incubateur), les indices de saturation des solutions à différents temps par rapport aux phases solides susceptibles de précipiter dans le milieu (cf. Matériel et Méthode, § 2.1.6). Le milieu BG-11 est relativement riche en phosphore ; l'une des phases les plus susceptibles de précipiter dans ce milieu sont donc les phosphates de calcium.

Au cours de la croissance de la culture, la température est maintenue constante ; nous avons vu que le pH augmente, les concentrations en calcium et en phosphore diminuent et la concentration en carbone inorganique dissous augmente. Ces valeurs pour plusieurs temps de culture, ainsi que les concentrations précises des autres éléments qui

sont peu modifiées au cours du temps sont entrées dans le logiciel de calcul de spéciation Visual MINTEQ. Les indices de saturation pour les phases contenant du calcium sont présentés dans le Tableau 2.1 à plusieurs temps pour l'un des réplicats d'une culture de *G. lithophora* C7.

Deux phases uniquement présentent des indices de saturation positifs : la fluorapatite et l'hydroxyapatite, ce qui signifie que seules ces deux phases sont susceptibles de précipiter. Si en principe le fluor n'entre pas dans la composition du BG-11, on en trouve expérimentalement à certain instants (notamment à 0 ; à 282 et à 450 h) jusqu'à 2-3 μM dans les analyses. Il y a donc une contamination qui pourrait effectivement permettre la précipitation de fluorapatite, mais seulement en faible quantité : en effet, les quelques micromoles de fluor par litre ne peuvent pas expliquer la disparition presque complète du calcium (initialement, 245 μM de calcium sont présents dans les cultures). Le prélèvement fait à 186 h ne contient pas de fluor, il est donc possible que la contamination vienne de la préparation de l'échantillon pour la mesure en ICP-AES.

La deuxième phase pour laquelle le milieu est sursaturé est l'hydroxyapatite. Ce minéral est formé de phosphore et de calcium avec pour formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, c'est-à-dire avec un rapport Ca/P d'environ 1,67 dans le solide. Si la diminution de la concentration en calcium vient principalement de la précipitation abiotique d'hydroxyapatite, alors la diminution de la concentration en calcium et celle du phosphore sont liées par un rapport d'environ 1,67 (des hydroxyapatites moins stœchiométriques ont des rapports Ca/P légèrement moins élevés). On remarque que l'indice de saturation pour l'hydroxyapatite devient négatif pour les deux derniers temps de mesure. Ceci peut être expliqué par le fait qu'il n'y a plus de calcium ni de phosphate dans le milieu. On peut noter par conséquent que ce n'est pas la solubilité de l'hydroxyapatite qui contrôle les concentrations en calcium et phosphate en solution puisque l'on descend en dessous de la solubilité de cette phase. Le milieu n'est sursaturé pour aucune autre phase de phosphate de calcium (du moins celles dont on connaît la solubilité).

Tableau 2.1 : Indices de saturation, calculés par le logiciel Visual MINTEQ, par rapport à différentes phases contenant du calcium dans un réplikat de *G. lithophora* C7 pour différents temps d'incubation.

Temps (h)	0	186	282	450	645	954
ACC	-2,816	-2,484	-2,421	-1,757	-2,042	-2,564
Anhydrite	-3,313	-3,36	-3,391	-3,702	-5,289	-5,697
Aragonite	-2,132	-1,801	-1,738	-1,074	-1,358	-1,881
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am1)	-3,995	-3,736	-3,772	-3,891	-9,16	-12,763
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am2)	-1,265	-1,006	-1,042	-1,161	-6,43	-10,033
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (beta)	-1,003	-0,743	-0,779	-0,899	-6,168	-9,771
Ca ₄ H(PO ₄) ₃ :3H ₂ O(s)	-1,926	-1,703	-1,788	-2,299	-10,061	-15,204
CaCO ₃ xH ₂ O(s)	-3,315	-2,983	-2,92	-2,256	-2,541	-3,063
CaHPO ₄ (s)	-1,228	-1,264	-1,313	-1,705	-4,197	-5,737
CaHPO ₄ :2H ₂ O(s)	-1,484	-1,521	-1,57	-1,962	-4,454	-5,994
Calcite	-1,992	-1,66	-1,597	-0,934	-1,218	-1,74
CaMoO ₄ (s)	-2,119	-2,164	-2,199	-2,494	-4,001	-4,317
Dolomite						
(disordered)	-4,158	-3,495	-3,341	-1,774	-1,022	-2,016
Dolomite (ordered)	-3,628	-2,965	-2,811	-1,244	-0,492	-1,486
Ettringite	-26,786	-27,192	-27,067	-27,067	-33,702	-36,314
FCO ₃ -Apatite	10,684	-13,851	10,869	11,1	-2,875	-11,974
Fluorite	-5,095	-25,717	-5,78	-6,071	-7,242	-7,156
Gypsum	-3,087	-3,134	-3,165	-3,475	-5,062	-5,47
Huntite	-11,215	-9,886	-9,55	-6,177	-3,352	-5,29
Hydroxyapatite	5,213	5,767	5,745	5,898	-2,148	-7,813
Lime	-21,08	-20,748	-20,685	-20,021	-20,306	-20,828
Portlandite	-11,273	-10,942	-10,878	-10,215	-10,499	-11,022
Powellite	-2,068	-2,113	-2,148	-2,443	-3,95	-4,266
Vaterite	-2,545	-2,214	-2,151	-1,487	-1,772	-2,294

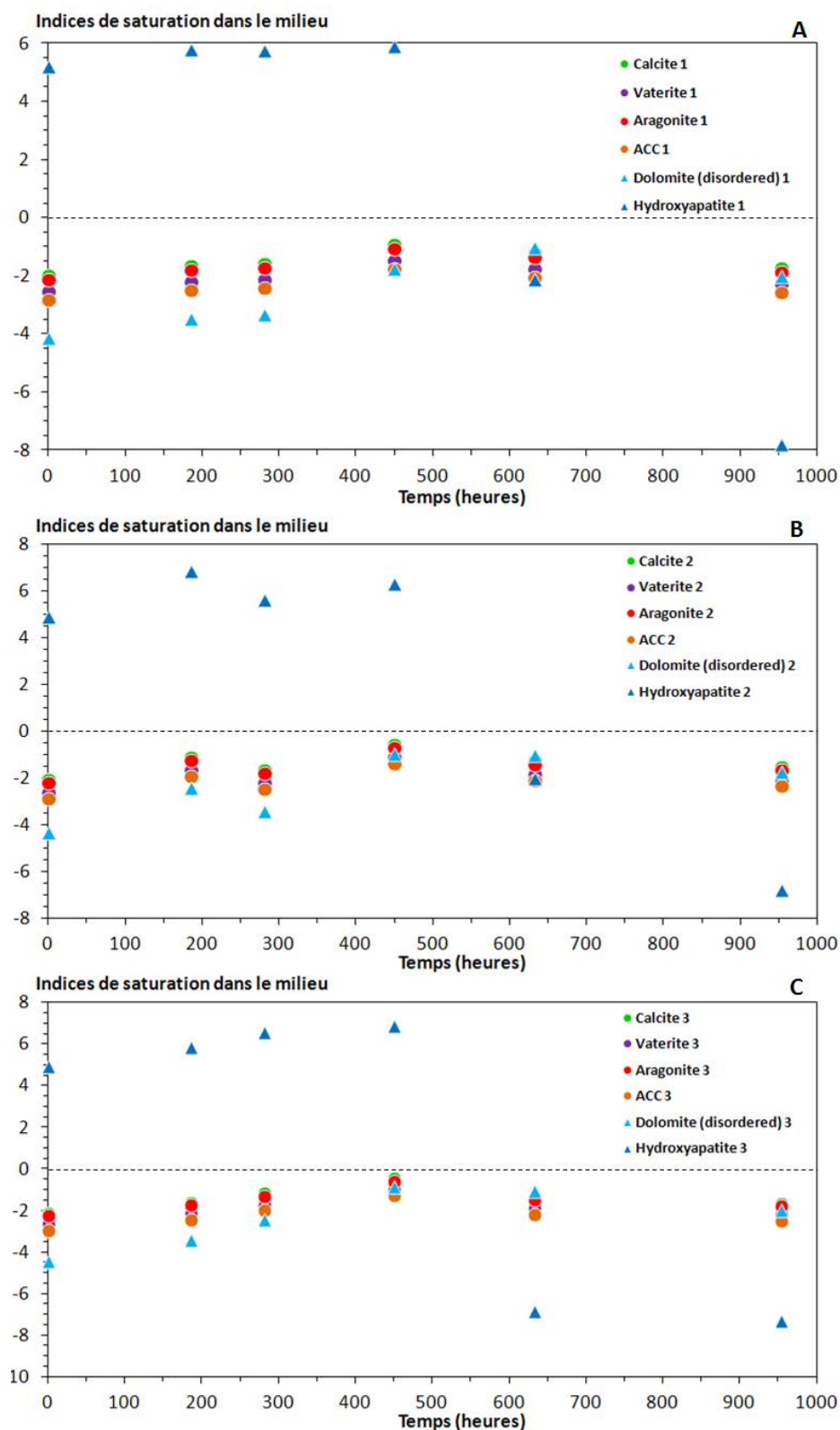


Figure 2.4 : Indices de saturation du milieu extracellulaire par rapport à différentes phases contenant du calcium dans les cultures de *Gloeomargarita lithophora* C7 sous lumière continue à 30°C. Le logiciel de spéciation chimique Visual MINTEQ a été utilisé. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats. La constante de saturation retenue pour l'amorphe de carbonate de calcium est $2,32 \cdot 10^{-8} \text{ M}^2$ déterminée par Kellermeier et al. (2014).

La Figure 2.4 présente les indices de saturation de la solution extracellulaire de C7 pendant sa croissance par rapport à différents carbonates de calcium (calcite, aragonite, vaterite et amorphe) ainsi que l'hydroxyapatite et la dolomite ($\text{MgCa}(\text{CO}_3)_2$). Pour les trois réplicats, la solution est constamment sous-saturée par rapport aux carbonates. Comme vu dans le Tableau 2.1, le milieu est sursaturé pour l'hydroxyapatite puis devient sous-saturé.

Il est à noter que le pH des solutions aux différents temps est utilisé pour calculer les indices de saturation. Ces mesures comprennent le pH global de la solution et ne tiennent pas compte de l'environnement local autour des cyanobactéries, qui est peut-être plus basique.

Nous avons vu que la solution dans son ensemble est sursaturée pour l'hydroxyapatite dans les premiers jours de culture. Les minéraux de phosphates de calcium peuvent être caractérisés selon leur rapport Ca/P (Tableau 2.2). Si la diminution des concentrations en calcium et en phosphore est due à la précipitation d'une seule phase de phosphate de calcium alors le rapport Ca/P de ce qui a été soustrait de la solution doit être constant et doit correspondre à ce même rapport dans la phase minérale.

Tableau 2.2 : Les différentes phases de phosphates de calcium et leur rapports Ca/P contenus dans ces phases.

Phosphate de calcium	Formule	Ca/P
Phosphate monocalcique	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
Phosphate dicalcique	CaHPO_4	1
Phosphate octacalcique	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	1,33
Phosphate tricalcique	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hydroxyapatite	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	1,67
Phosphate tétracalcique	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2

Le rapport calcium sur phosphore de ce qui est soustrait à la solution (mesurées respectivement par ICP-AES et par colorimétrie en flux continu) est reporté en fonction du temps en Figure 2.5.

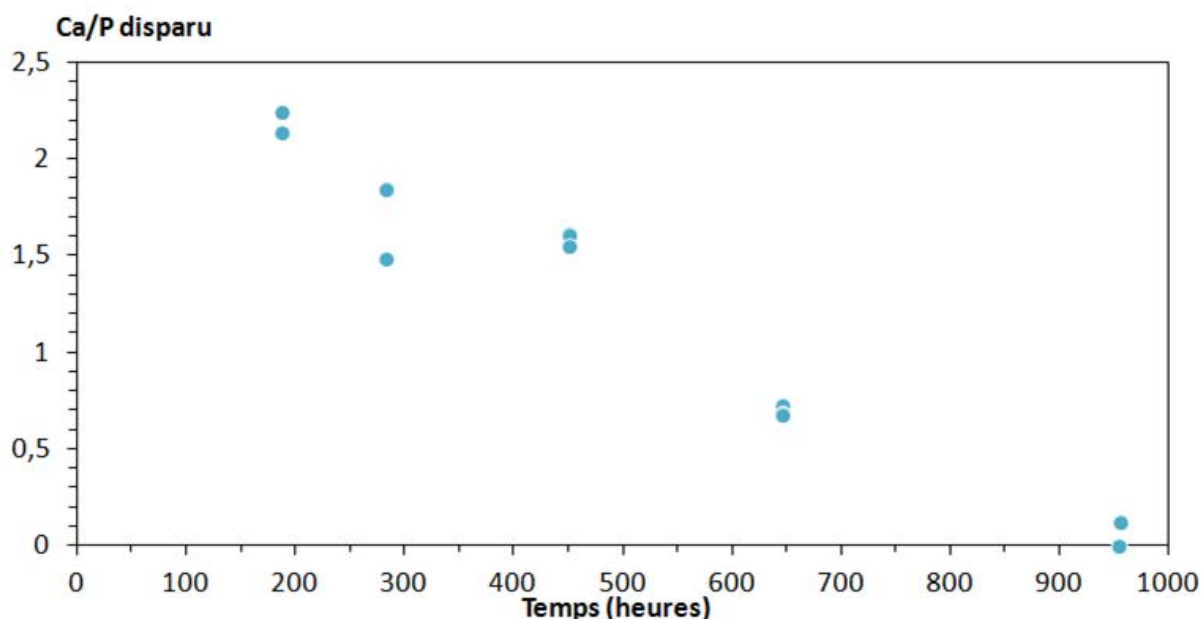
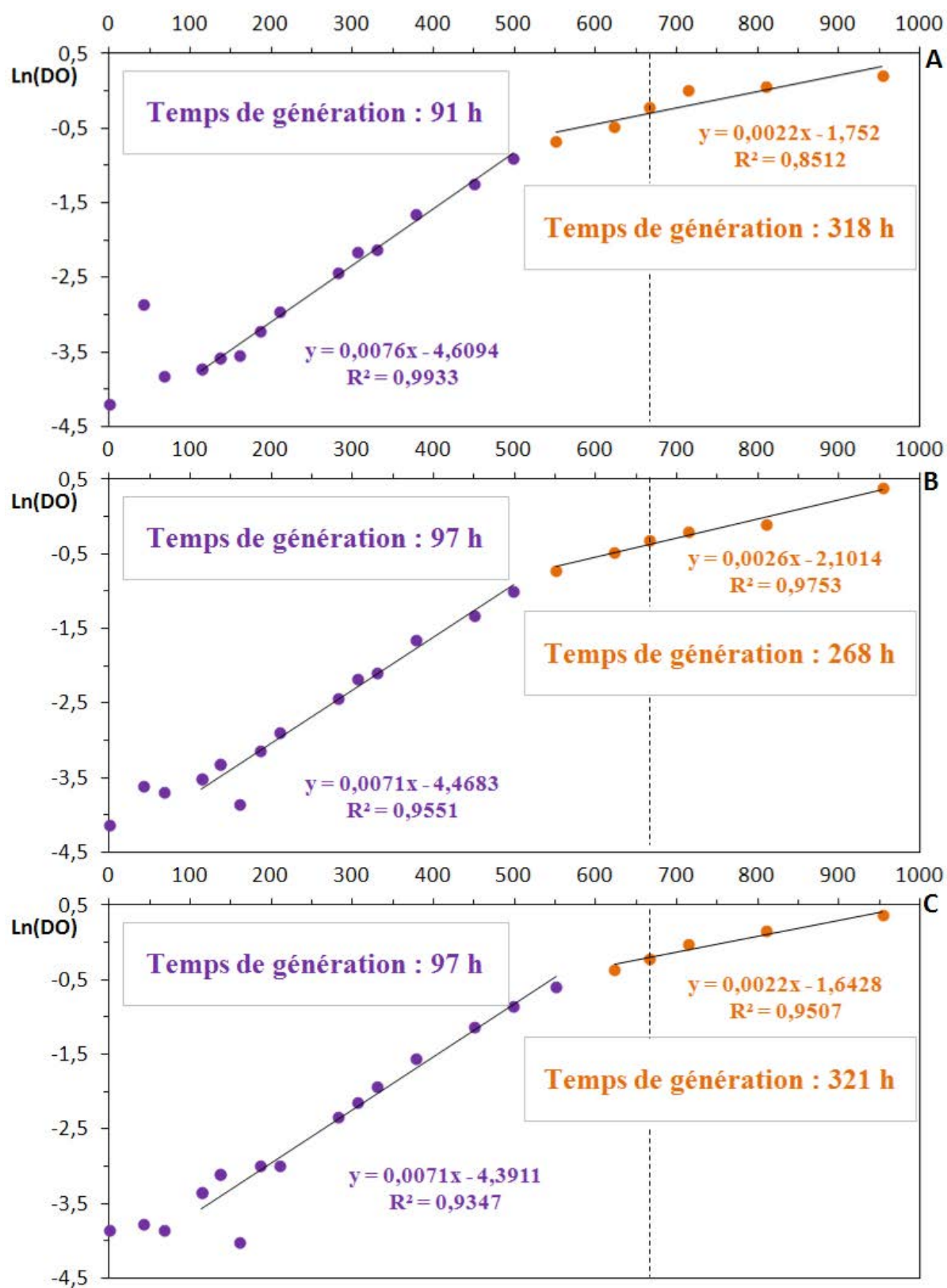


Figure 2.5 : Rapport de la diminution du Ca sur celle du P dans la solution de trois réplicats de culture de *G. lithophora* C7. La concentration en calcium a été mesurée par ICP-AES et le phosphore par colorimétrie en flux continu.

Le rapport Ca/P de la fraction qui a été ségrégée de la solution n'est pas constant dans le temps (Figure 2.5). Il est de $\sim 2,2$ dans deux des réplicats au début et diminue jusqu'à $\sim 0,7$ vers 650 h. Le rapport initial, supérieur à 2, n'est compatible avec aucune forme de phosphate de calcium connue. De plus, ce rapport change dans le temps : les concentrations en calcium et en phosphore en solution ne peuvent donc pas être expliquées par un phénomène de précipitation d'une phase unique contenant ces deux éléments. La diminution du calcium ne peut donc pas venir de l'unique précipitation d'hydroxyapatite dans le milieu.

En résumé, la disparition du calcium au cours du temps ne semble pas pouvoir s'expliquer simplement par un phénomène de précipitation abiotique dans le milieu de culture. Les observations en microscopie électronique permettront de confirmer l'absence de précipité extracellulaire contenant du calcium.

La mesure de la DO à 730 nm du milieu permet de suivre l'évolution de la densité cellulaire en fonction du temps. En traçant le logarithme népérien de la DO en fonction du temps, on peut déterminer les différentes phases de croissance. La Figure 2.6 présente ces logarithmes pour six cultures de la souche *Gloeomargarita lithophora* C7. Les phases de linéarité correspondent aux phases de croissance exponentielle des cultures ; en divisant $\ln 2$ par la pente, on obtient le temps de doublement de la population, appelé "temps de génération". Cette représentation permet de déterminer qu'il y a parfois plusieurs phases pendant lesquelles la croissance de la culture suit une évolution exponentielle avec des taux variables. Nous avons donc comparé non seulement la première phase de croissance exponentielle mais aussi les suivantes. Les points de changement de régime de croissance peuvent indiquer des changements d'état physiologique, et il est intéressant de poser la question d'un éventuel lien avec la formation de carbonates de calcium intracellulaires.



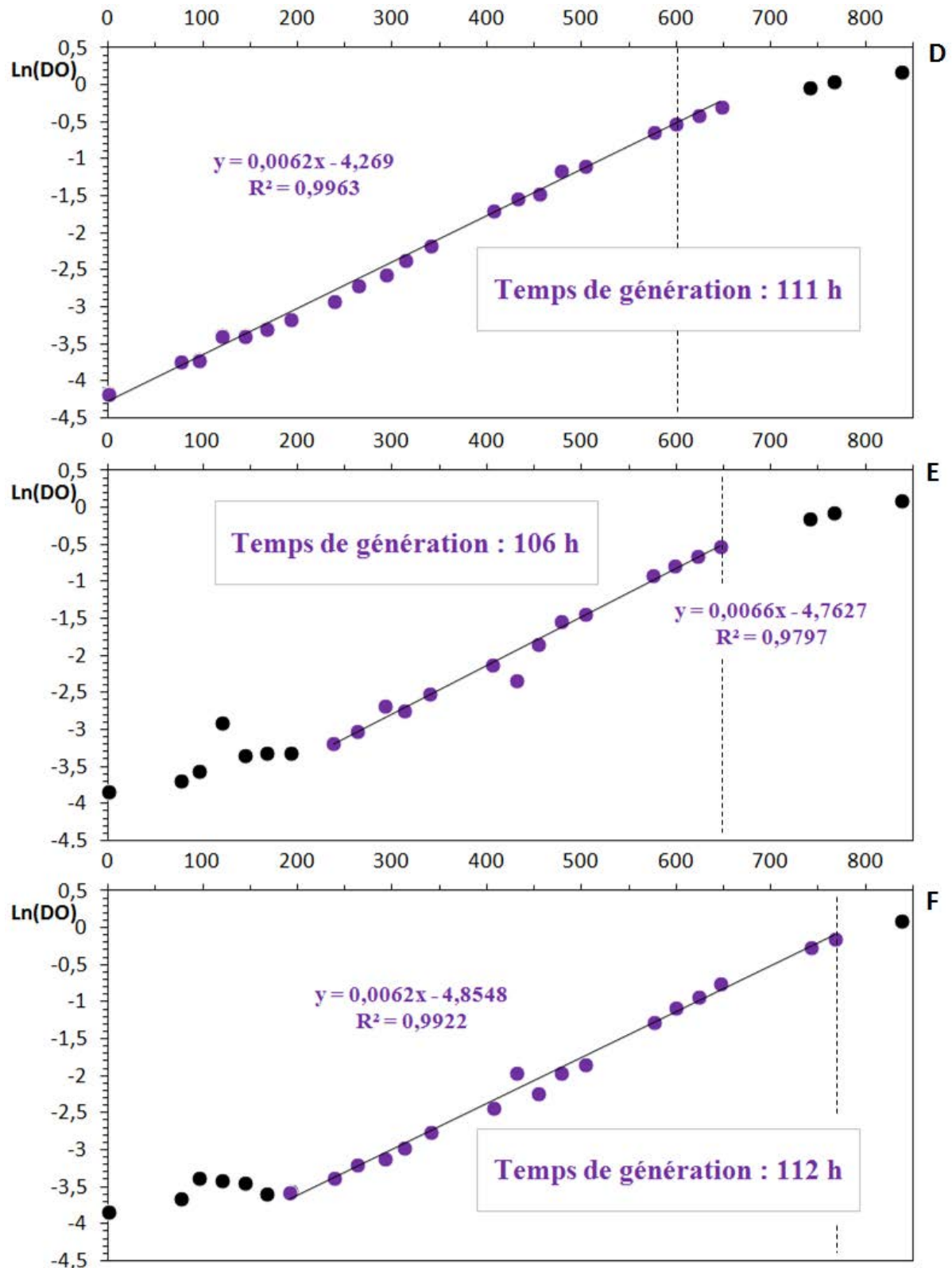
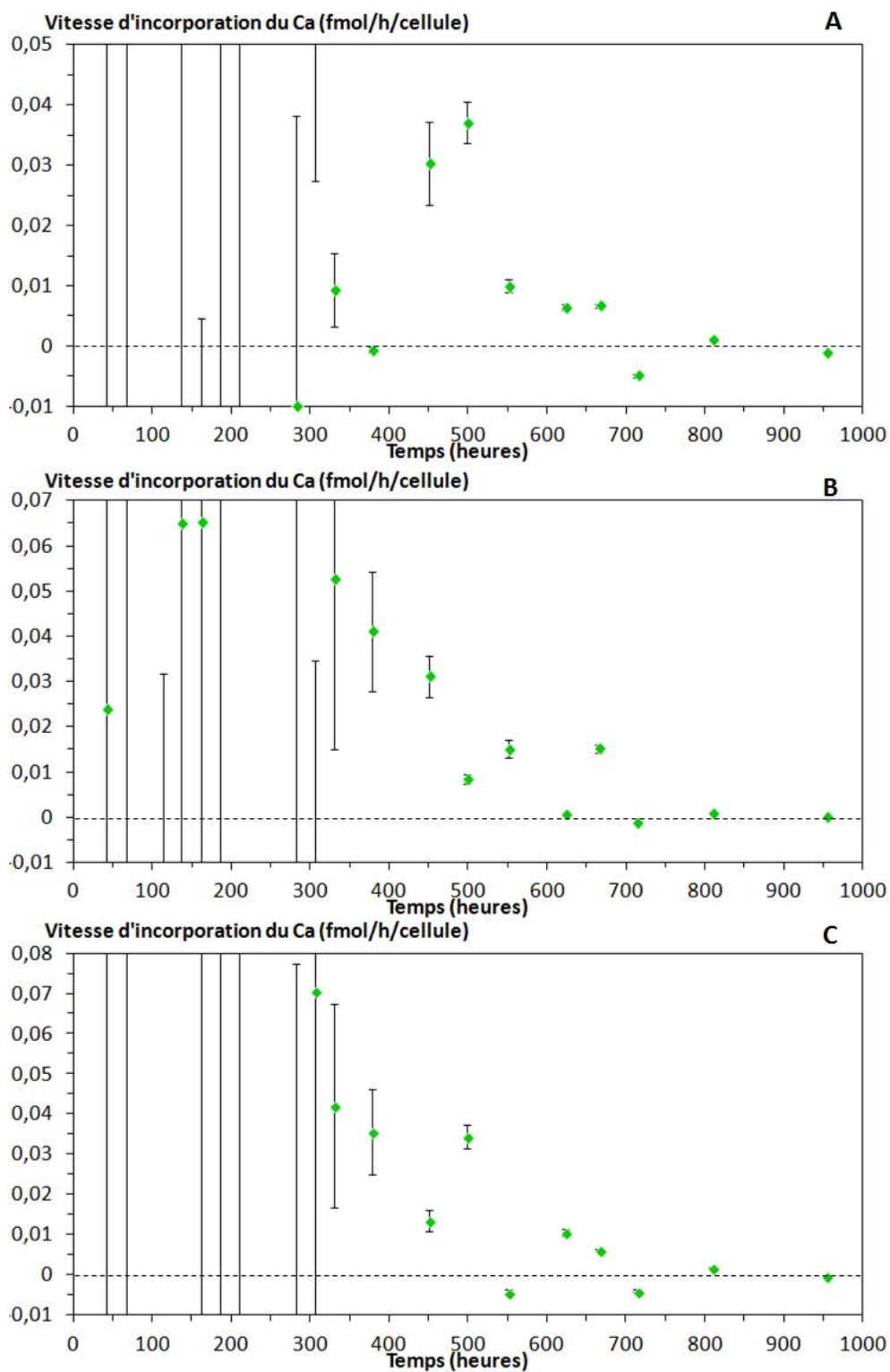


Figure 2.6 : Culture de *G. lithophora* C7 dans du BG-11. Logarithme népérien de la DO durant la croissance. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats et D, E et F correspondent à trois autres. Les lignes en tirets représentent le premier point pour le lequel la concentration en calcium commence à atteindre sa valeur minimale.

Le premier ensemble de triplicats présente deux phases de croissance exponentielle sur la durée de l'expérience. Le deuxième lot de triplicats ne présente qu'une seule phase. Le temps de génération dans la première phase exponentielle du premier ensemble ainsi que le temps de génération des cultures du deuxième ensemble de triplicats sont très proches. Pour cette souche et dans ces conditions de culture, le temps de génération de la première phase est assez reproductible, entre 91 et 112 h. Cette phase exponentielle ne dure pas toujours le même temps (entre 400 et 650 h) et ne se termine pas strictement en même temps que la décroissance de la concentration en calcium.

En utilisant la relation entre la DO à 730 nm de la culture et la densité cellulaire (Matériel et Méthodes, § 1.2), nous pouvons normaliser les vitesses d'incorporation du calcium par rapport au nombre de cellules à chaque instant. La Figure 2.7 présente ces vitesses en fonction du temps dans six réplicats de cultures de *G. lithophora* C7. Durant les 250-300 premières heures, ces vitesses apparaissent comme très variables, très grandes ou parfois négatives. Il s'agit en fait d'un artefact : il y a, à ce moment, peu de cellules et peu d'incorporation du calcium et le bruit dans les vitesses d'incorporation du calcium est par conséquent très élevé.



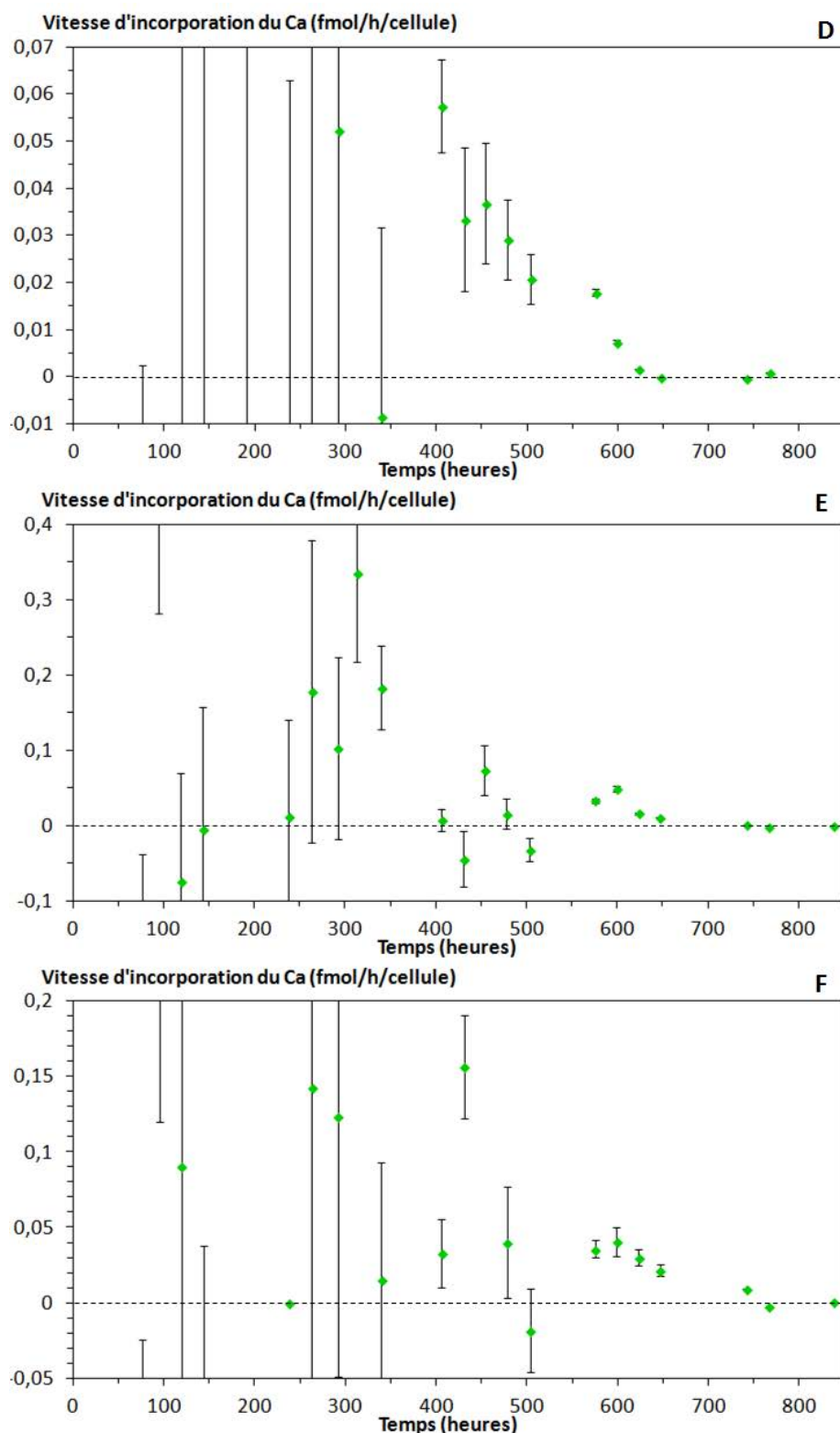


Figure 2.7 : Culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11. Vitesses d'incorporation du calcium déterminées par les mesures de la concentration e calcium par colorimétrie. Les graphiques A, B et C correspondent à trois répliquats et D, E et F correspondent à trois autres répliquats.

La vitesse d'incorporation du calcium décroît avec le temps. Ces vitesses, durant la phase de décroissance du calcium dans les six cultures, peuvent alternativement être reportées en fonction de la concentration en calcium du milieu en Figure 2.8.

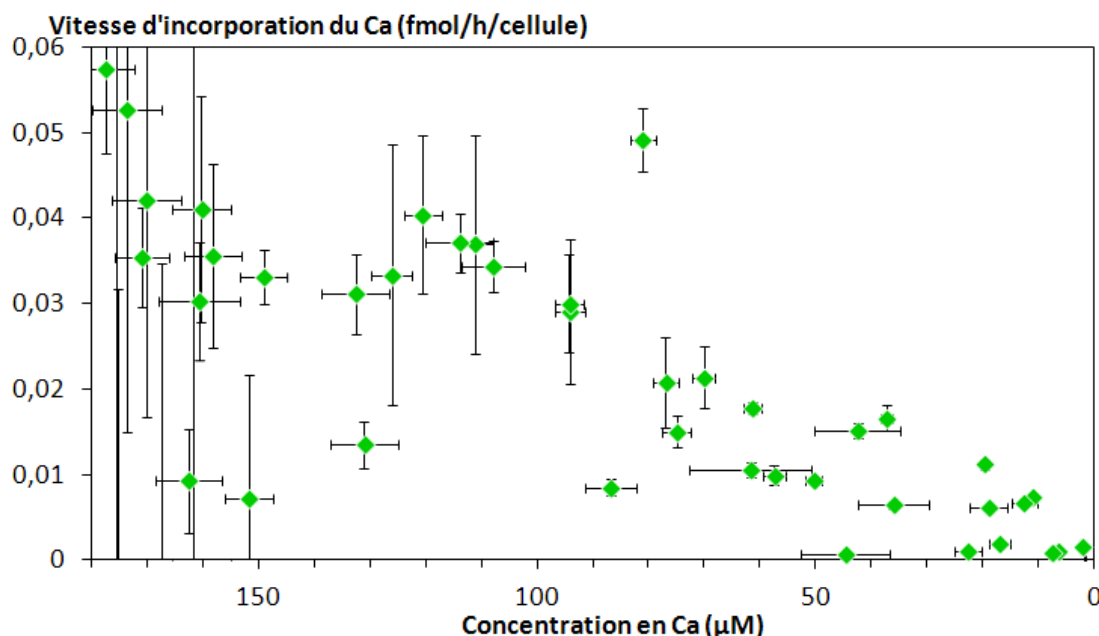
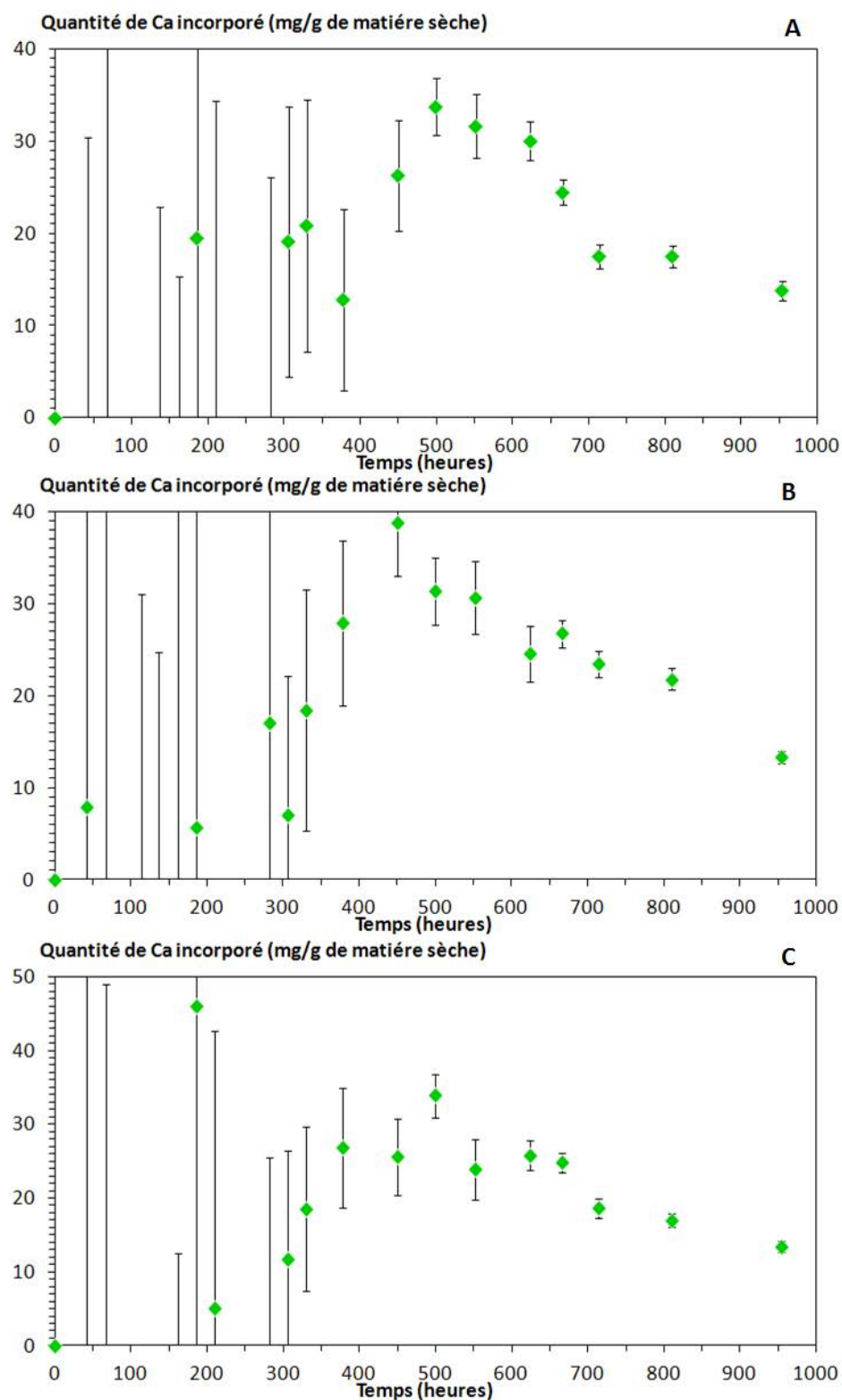


Figure 2.8 : Culture de *G. lithophora* C7 dans un milieu BG-11. Vitesses d'incorporation du calcium en fonction de sa concentration dans les six cultures. Seules les valeurs correspondantes aux phases de décroissances sont prises en compte. Les concentrations en calcium ont été mesurées par colorimétrie.

La vitesse d'incorporation du calcium dans les cellules semble augmenter avec la concentration en calcium du milieu jusqu'à un plateau autour de 0,04 fmol/h/cellule atteint à une concentration autour de 100 µM de Ca extracellulaire. Cette tendance pourrait être compatible (entre autres hypothèses) avec une incorporation du calcium dans les cellules par simple diffusion mais avec un effet de saturation qui resterait alors à expliquer. Plus la concentration en calcium dans le milieu est élevée et plus le calcium entre rapidement dans le milieu intracellulaire des cellules. Si l'entrée du calcium se fait effectivement par un mécanisme de diffusion alors l'incorporation devrait être stoppée quand le potentiel électrochimique du calcium est à l'équilibre au niveau de la membrane plasmique de la cellule. Il se peut donc qu'il y ait une diffusion facilitée du calcium du milieu extracellulaire vers l'intérieur des cellules et que l'équilibre soit atteint pour 3 µM du côté extérieur de la membrane plasmique de C7.

Nous avons, d'autre part, normalisé la quantité massique de calcium incorporé par la masse des cellules (cf. Matériel et Méthodes, § 1.2.). Ces données sont reportées en fonction du temps en Figure 2.9 pour les six cultures.



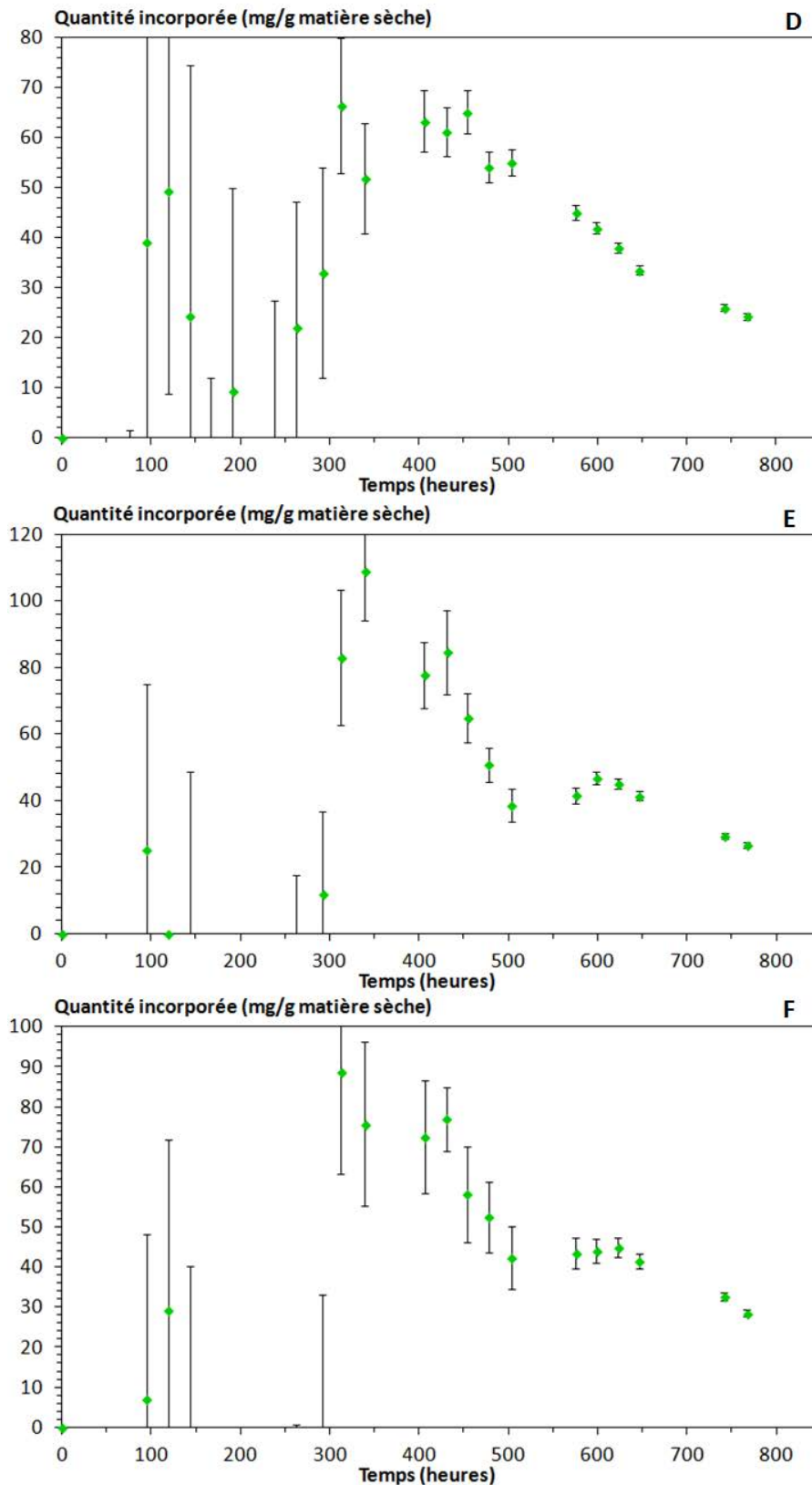


Figure 2.9 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11. Quantités massiques de calcium incorporé déterminées par les mesures en colorimétrie de la concentration en calcium. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats et D, E et F correspondent à trois autres réplicats.

On voit que le début de la phase de décroissance de la concentration en calcium correspond à une augmentation de la quantité de calcium incorporée par gramme de masse cellulaire. Il y a au début des expériences, des vitesses apparentes négatives dues à des variations non significatives sur les concentrations en calcium mesurées. Le faible nombre de cellules pendant la latence donne de grandes valeurs absolues du quotient qui définit la vitesse.

Ensuite, cette quantité plafonne puis diminue quand le calcium est presque épuisé. En effet la croissance de la culture continue après l'épuisement du calcium en solution. La quantité maximale de calcium incorporée varie de 25 à 80 mg/g de matière sèche selon le réplicat ce qui correspond donc à 2-8 % du poids total des cellules.

Les cellules utilisées comme inoculum de ces cultures ont poussé dans un milieu BG-11 et contenaient du calcium. Nous ne savons pas la quantité de calcium qui a été incorporée par ces bactéries dans la pré-culture mais nous connaissons la DO qui était de 0,427. Dans les cultures suivies, les cellules à cette DO ont incorporé environ 31 mg de calcium par g de matière sèche. Si l'on fait l'hypothèse que les cellules de la pré-culture avaient incorporé cette quantité, dans la culture suivie les cellules contiennent 31 mg/g de matière sèche à $t = 0$. Ainsi nous pouvons redéterminer les quantités totales de calcium contenues dans les cyanobactéries en tenant en compte de cette quantité initiale présente dans les cellules de l'inoculum. La Figure 2.10 présente ces quantités dans les trois premiers réplicats (A, B et C) pour lesquels l'incorporation de calcium avait été tracée au cours du temps en Figure 2.9. On peut voir qu'il y a un grand écart entre les quantités incorporées pendant le suivi de la culture (Figure 2.9) et les quantités totales (Figure 2.10) tout au début lorsqu'il n'y a que les cellules de l'inoculum, mais que cet écart diminue fortement avec le temps. En effet, au début de la culture, la quantité de calcium initiale présente dans les cellules de l'inoculum représente une grande proportion. Avec le temps, la population de cellules augmente et cette quantité initiale représente peu par rapport aux dizaines de micromolaires incorporées par les cellules.

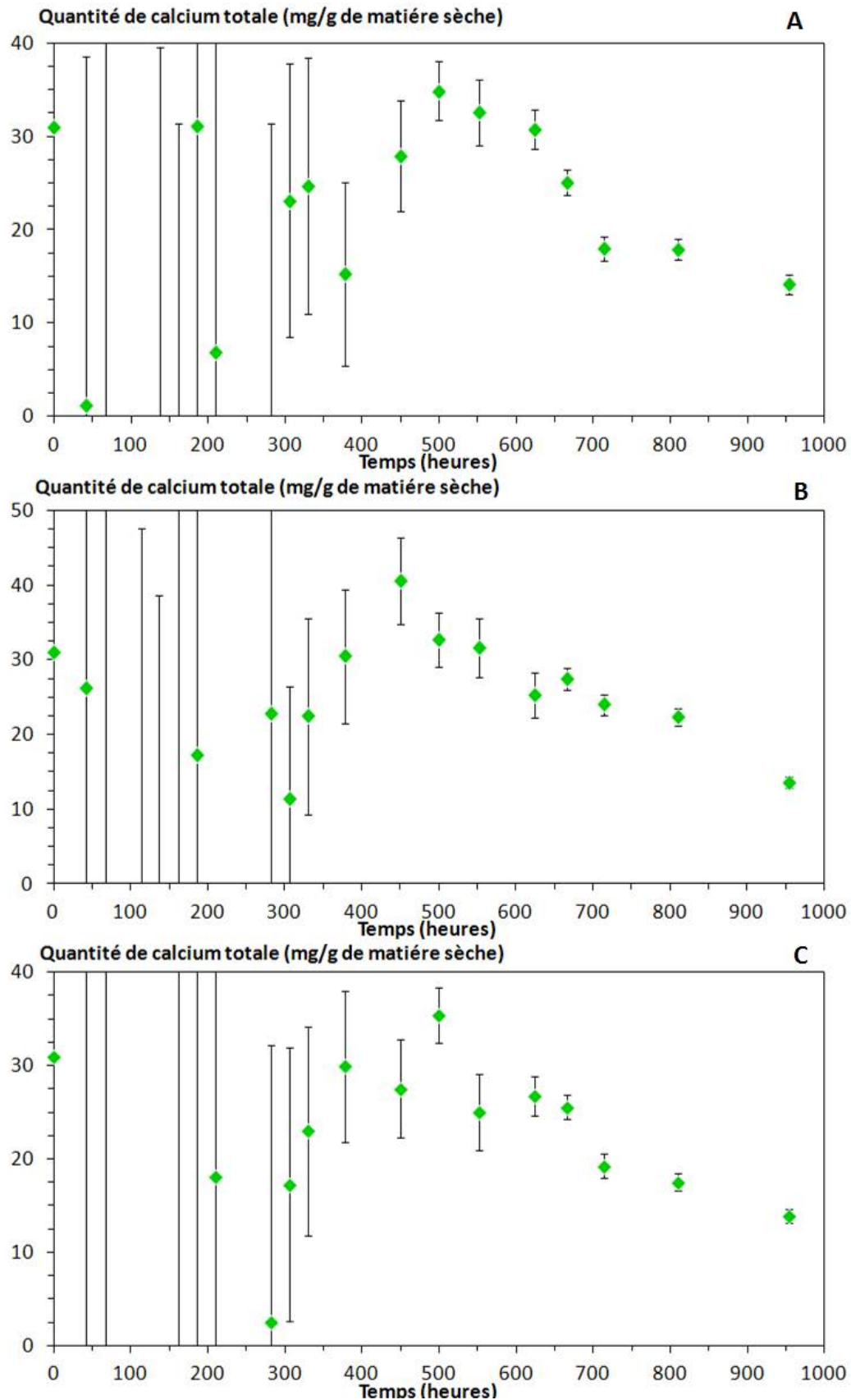


Figure 2.10 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11. Quantités massiques de calcium totales déterminées par les mesures en colorimétrie de la concentration en calcium. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats inoculés au 1/25^e.

2.1.2. Étude microscopique des carbonates intracellulaires

Des observations ont été faites en microscopie électronique en transmission à balayage (STEM) en mode High-Angle Annular Dark-Field (HAADF) à 6 instants différents sur une culture. La composition des carbonates a été analysée par EDXS. Le STEM permet de distinguer les cellules et les particules. Des études précédentes ont démontré que les carbonates de calcium amorphes sont situés à l'intérieur des cellules (e.g., (Couradeau et al., 2012; Benzerara et al., 2014)). De plus, toutes les souches cultivées dans cette thèse possèdent des polyphosphates, aussi bien les souches formant des carbonates intracellulaires que les autres. Les polyphosphates sont des chaînes linéaires de groupements phosphates liés par une liaison phosphoanhydride et sont concentrés dans les cellules sous la forme de particules de quelques centaines de nanomètres. Une étude faite en microscopie d'absorption X (STXM) sur des cyanobactéries a montré que ces inclusions intracellulaires avait une signature typique de polyphosphates au seuil $L_{2,3}$ du phosphore (Li et al., en préparation). Ces particules ont la capacité de stocker des cations comme le potassium, le magnésium et le calcium.

La Figure 2.11 présente une observation en STEM-EDXS de plusieurs inclusions intracellulaires de carbonates et de polyphosphates. On peut distinguer les carbonates de calcium, sphériques et clairs et les polyphosphates de forme moins régulière et plus foncés. La cartographie montre bien les différences de composition de ces deux types d'inclusion. Sur la base des K-facteurs, on peut déterminer que les carbonates ont un rapport atomique $Mg/(Mg+Ca)$ d'environ 10 %. Les polyphosphates contiennent du potassium, du calcium et du magnésium. La cartographie du calcium montre que les polyphosphates contiennent du calcium mais que les carbonates sont les zones principales d'accumulation du calcium dans les cellules.

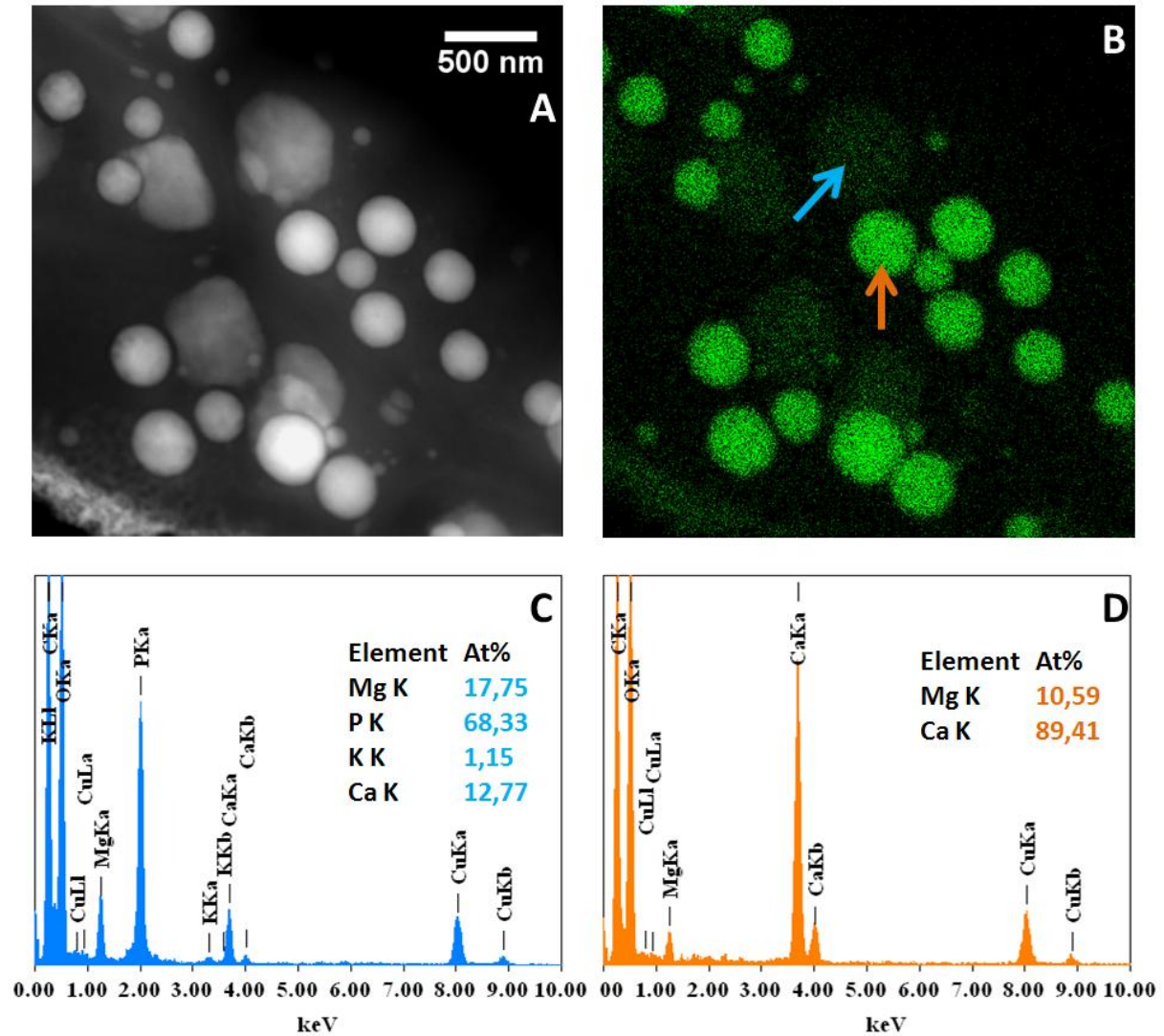


Figure 2.11 : Culture de *G. lithophora* C7 dans du BG-11 à $t = 0$ h. (A) Image STEM en mode HAADF d'un groupe de cellules. (B) Cartographie EDXS correspondante du calcium. (C) Spectre EDXS d'un polyphosphate. (D) Spectre d'un carbonate.

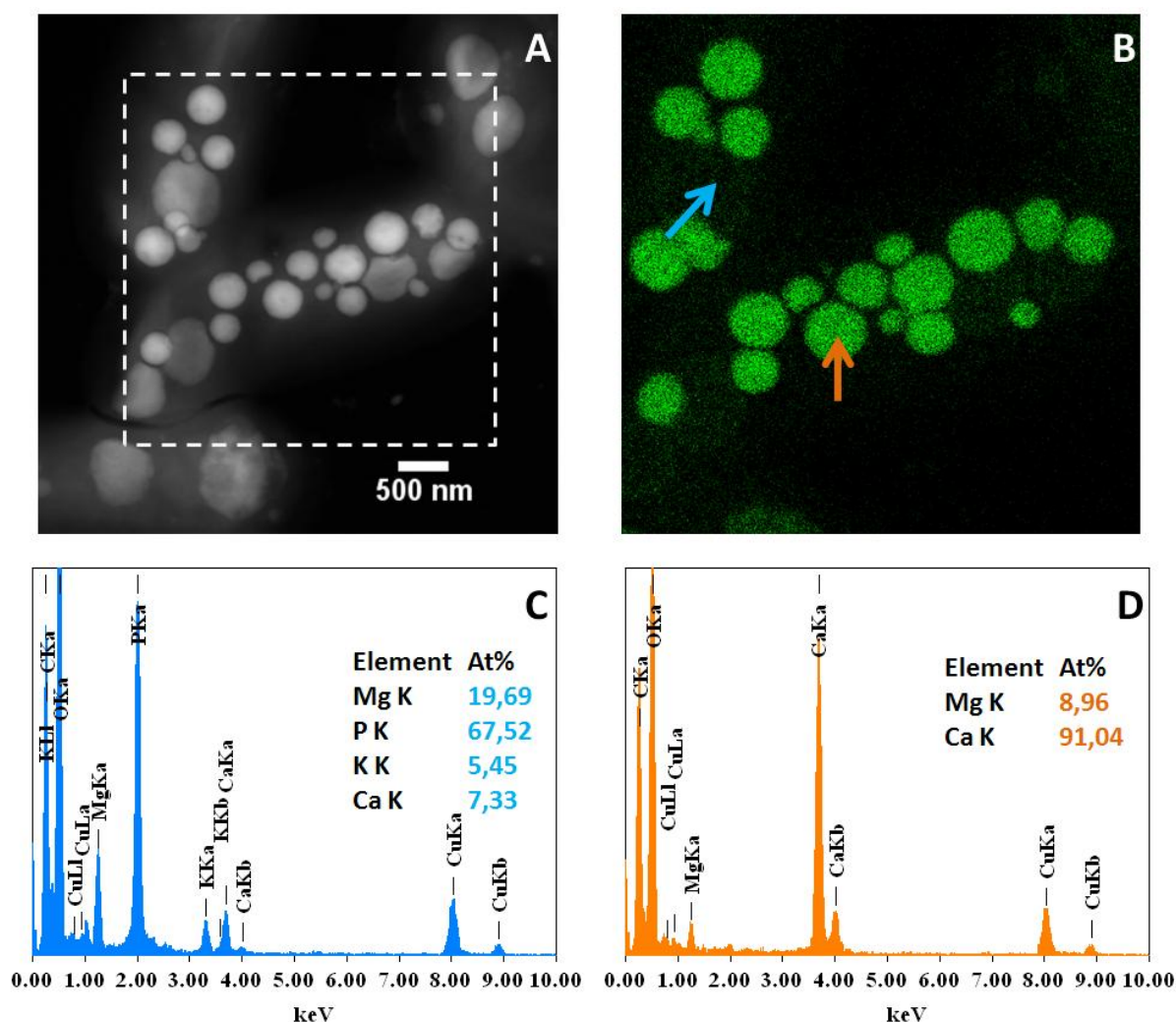


Figure 2.12 : Culture de *Gloeomargarita lithophora* C7 à $t = 186$ h ; l'incorporation est de 50 ± 29 mg de calcium / g de matière sèche. (A) Images STEM HAADF de plusieurs cellules. (B) Cartographie du calcium en EDXS. (C) Spectre d'un polyphosphate. (D) Spectre d'un carbonate de calcium.

La Figure 2.12 présente une image en STEM de cellules d'une culture de *G. lithophora* C7 à $t = 186$ h, pour laquelle il reste $200 \mu\text{M}$ de calcium dans le milieu. Là encore les zones les plus concentrées en calcium sont les carbonates intracellulaires. Des relevés sur plusieurs carbonates de calcium permettent de déterminer qu'ils contiennent du magnésium à hauteur de $9,8 \pm 2,0$ atome % des cations (Ca + Mg).

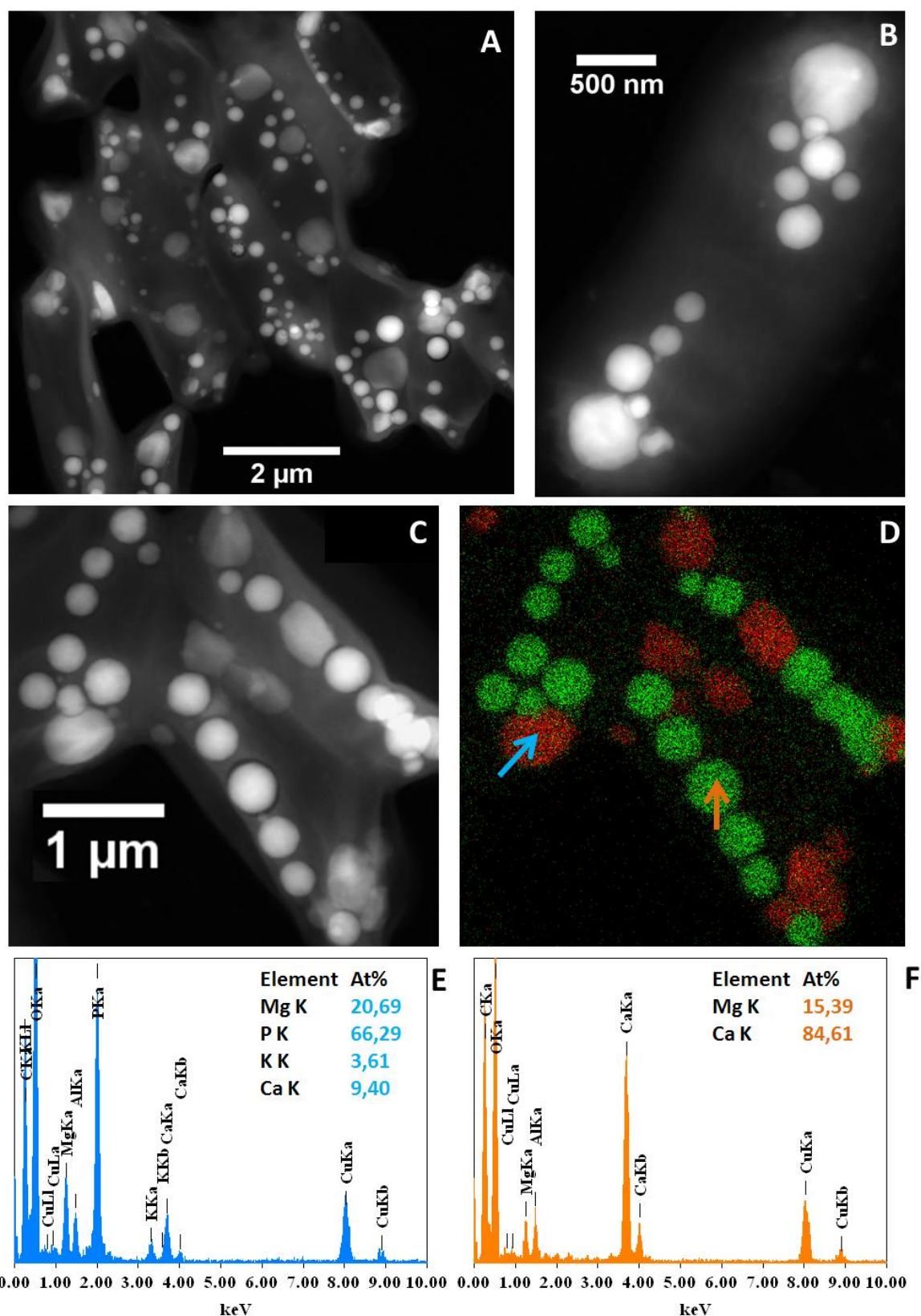


Figure 2.13 : Culture de *G. lithophora* C7 dans du BG-11 après 450 h d'incubation à 30 °C sous lumière continue ; l'incorporation du calcium est au maximum (39 mg/g de matière sèche). (A), (B) et (C) Images STEM HAADF de plusieurs cellules. (D) Cartographie EDXS du calcium (vert) et du phosphore (rouge) de l'image (C). (E) Spectre EDXS d'un polyphosphate. (F) Spectre d'un carbonate de calcium.

La Figure 2.13 présente les mêmes observations à $t = 450$ h. La concentration en calcium résiduelle dans la solution extracellulaire est d'environ $80 \mu\text{M}$: nous sommes dans la phase de décroissance du calcium. Les zones des cellules riches en calcium sont toujours les carbonates. La majeure partie du calcium incorporée par les cellules à partir du milieu extérieur se trouve donc dans ces inclusions intracellulaires. Des analyses en EDXS sur 54 particules de carbonates de calcium montrent qu'elles contiennent en moyenne $11,6 \pm 2,6$ % de magnésium. Cette moyenne est comparable avec ce qui a été vu plus tôt dans les mêmes cultures. Pendant la phase d'incorporation du calcium, la teneur en magnésium dans les carbonates intracellulaires formés reste constante.

A l'instant $t = 645$ h, le calcium a atteint sa valeur minimale pour les cultures de C7, environ $3 \mu\text{M}$.

Grâce à la différence de contraste et de morphologie entre les polyphosphates et les carbonates, on peut déterminer le nombre d'inclusions de carbonates de calcium intracellulaires par cellule et leurs tailles. Les résultats pour 6 temps d'observation sont donnés dans le Tableau 2.3.

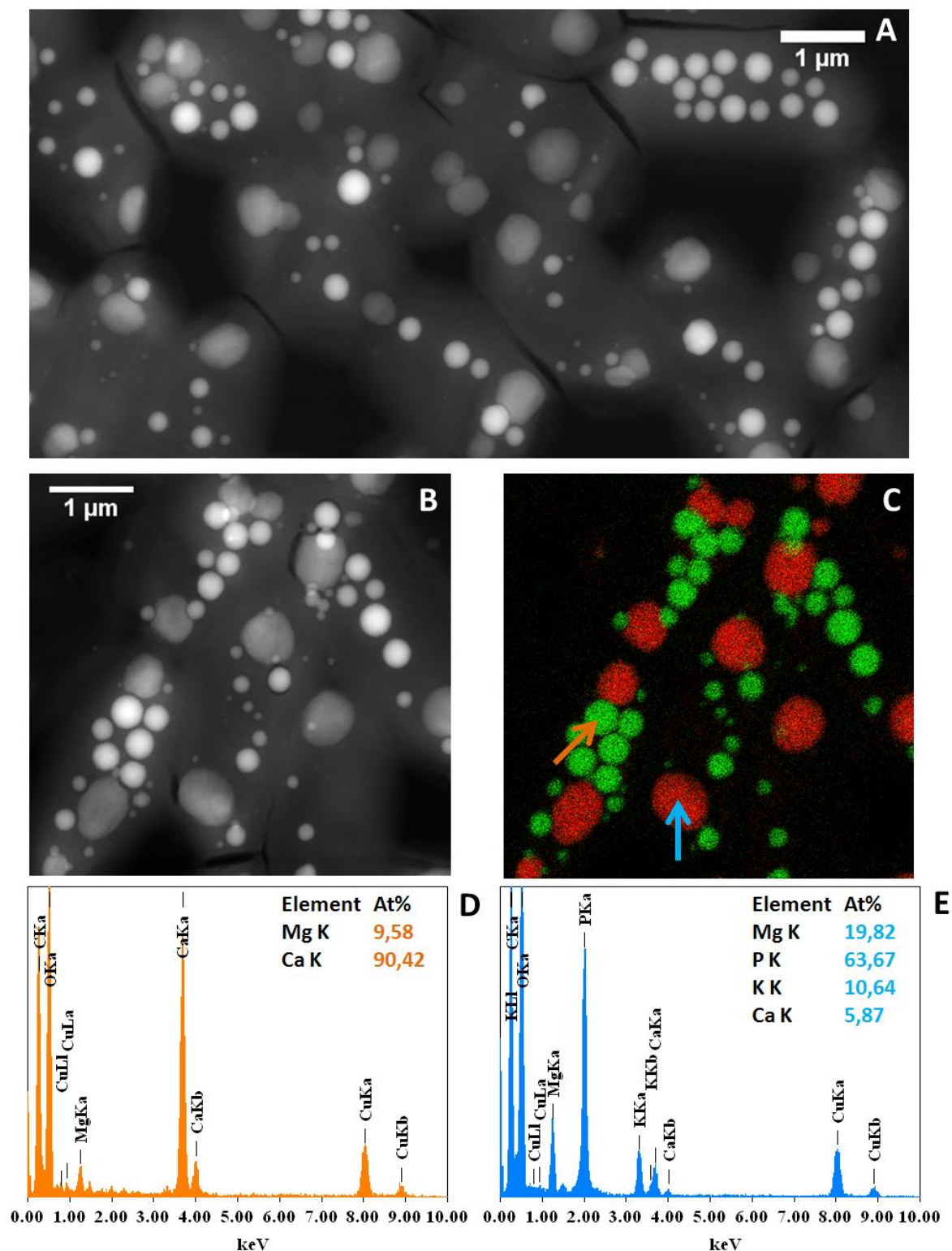


Figure 2.14 : Culture *Gloeomargarita lithophora* C7 à t=645 h ; l'incorporation est de 27 mg/g de matière sèche. (A) et (B) Images STEM HAADF de plusieurs cellules. (C) Cartographie du calcium (vert) et du phosphore (rouge) en EDXS correspondante à l'image (B). (D) Spectre EDXS d'un carbonate de calcium. (E) Spectre d'un polyphosphate.

Tableau 2.3 : Mesures des inclusions de carbonates de calcium intracellulaire faites en STEM-HAADF ; la densité des carbonates utilisée est 2,18 (Fernandez-Martinez et al., 2013). Les mesures de calcium total compris dans les cellules tiennent compte de celui apporté par la pré-culture et du calcium incorporé, déduit des concentrations mesurées par ICP-AES. Des analyses EDXS des carbonates intracellulaires ont permis de déterminer le pourcentage de substitution du magnésium. Ainsi les quantités de calcium présent dans les carbonates et la proportion de calcium présent dans les cellules sous forme de carbonate intracellulaire ont été déterminées. La densité de cellules sur la grille préparée à 954 h était trop grande pour pouvoir distinguer les cellules entre elles.

Gloeomargarita lithophora C7												
temps (h)	MET											
	nombre mesuré		nombre d'inclusion par cellule			diamètre des inclusions (nm)			volume d'inclusion par cellule (µm³)			
	cellules	inclusions										
0	31	219	7,1	±	3,5	218	±	82	0,055	±	0,036	
186	54	369	6,8	±	6,4	221	±	89	0,059	±	0,070	
282	116	765	6,6	±	5,1	201	±	86	0,044	±	0,047	
450	83	520	6,3	±	5,3	211	±	80	0,045	±	0,043	
645	86	508	5,9	±	3,3	204	±	82	0,042	±	0,040	
954	-	411	-	±	-	197	±	68	-	±	-	
temps (h)	EDX			quantité de			ICP-AES (3 réplicas)			calcium dans les		
	substitution du magnésium (%)			calcium dans les carbonates (mg/g mat. sèche)			calcium total dans les cellules (mg/g mat. sèche)			carbonates (%)		
0	10,4	±	1,9	8,9	±	5,8	31			29	±	19
186	9,8	±	2,0	10	±	12	45	±	29	21	±	29
282	10,1	±	2,1	7,2	±	7,6	45	±	16	16	±	18
450	11,6	±	2,6	7,2	±	6,8	46,7	±	2,5	15	±	15
645	14,8	±	5,1	6,5	±	6,1	33,27	±	0,74	20	±	18
954	39	±	18	-	±	-	17,3	±	2,1	-	±	-

À $t = 0$ h, les cellules contiennent $7,1 \pm 3,5$ inclusions chacune d'un diamètre de 218 ± 82 nm. Chaque cellule contient donc en moyenne un volume de $0,055 \pm 0,036 \mu\text{m}^3$ de carbonate de calcium précipité (6,5 % des cellules ne contiennent aucun carbonate). En utilisant la masse d'une cellule de $4,08 \cdot 10^{-12}$ g pour la souche C7 (Matériel et Méthodes, § 1.2), la densité d'un carbonate de calcium amorphe ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $d = 2,18$) (Fernandez-Martinez et al., 2013) et le pourcentage de magnésium des carbonates, on peut déterminer que la quantité de calcium contenu dans les carbonates intracellulaires représente de l'ordre de $8,9 \pm 5,8$ mg par g de matière sèche. Dans la partie précédente (2.1.1), les quantités totales de calcium dans la cellule (par g de matière sèche) avaient été déterminées (Figure 2.10). On déduit de ces mesures, moyennant les hypothèses énoncées que 29 ± 19 % du calcium cellulaire se trouvent sous forme de carbonates intracellulaires. Cela confirme qu'une partie importante du calcium pris du milieu extracellulaire se retrouve dans les carbonates.

L'écart-type sur ces valeurs n'est ici pas une mesure de la précision de la mesure (nous sommes très précis sur la mesure du nombre d'inclusions et de leur diamètre) mais reflète l'hétérogénéité dans le phénotype d'une population de cyanobactéries : certaines cellules sont très chargées en inclusions de carbonates tandis que d'autres n'en comportent pas du tout. Le reste du calcium doit se trouver dans la solution du cytosol et/ou sous forme complexée, adsorbé à la surface des cellules et/ou dans les polyphosphates.

La Figure 2.15 présente un histogramme du nombre de cellules en fonction du volume de carbonates qu'elles contiennent après 186 h d'incubation. Sur 54 cellules, 14 présentent un volume inférieur à $0,005 \mu\text{m}^3$; la plupart de la population contient entre $0,01$ et $0,120 \mu\text{m}^3$. Cette dispersion se répercute sur les calculs de la quantité de calcium contenue dans les carbonates et sur la proportion du calcium qui se trouve dans ces inclusions : l'écart-type est très grand.

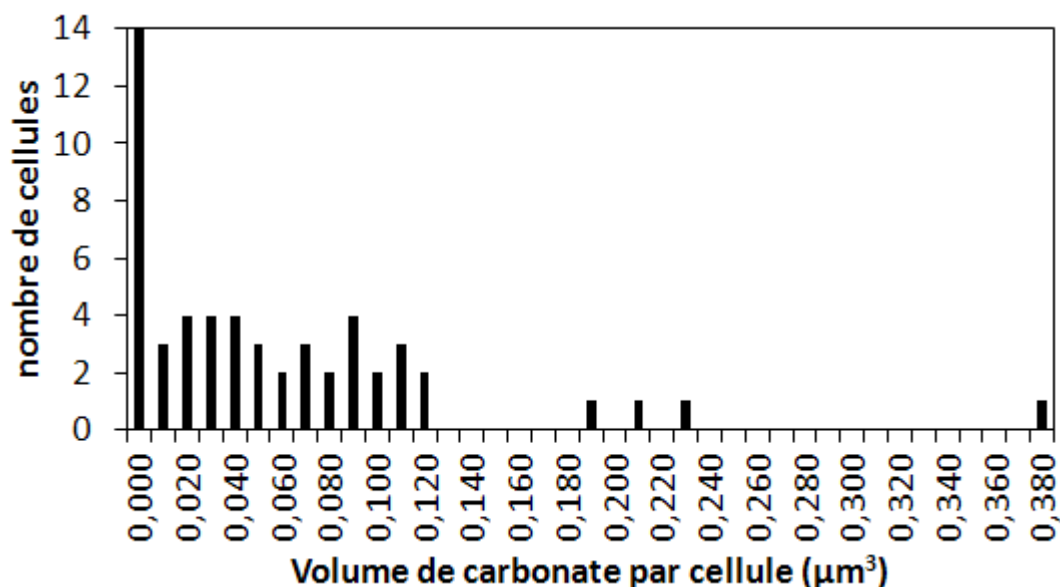


Figure 2.15 : Culture de *G. lithophora* C7 dans du BG-11 à $t = 186$ h. Distribution du volume de carbonate par cellules mesuré en STEM. La moyenne est de $0,059 \mu\text{m}^3$.

À $t = 450$ h, pendant l'incorporation du calcium, un comptage sur 83 cellules a permis de déterminer que chaque cellule contient $6,3 \pm 5,3$ carbonates avec un diamètre de 211 ± 80 nm. On peut déterminer que chaque cellule possède un volume d'inclusion de carbonate de calcium de $0,045 \pm 0,043 \mu\text{m}^3$. Comme précédemment, on peut calculer une quantité de calcium contenue par les carbonates intracellulaires de $7,2 \pm 6,8$ mg/g de matière sèche de cellule. La quantité totale de calcium incorporé calculée à partir des valeurs en solution (2.2.1) est de 39 mg/g de matière sèche. En prenant en compte le calcium apporté par les cellules de la pré-culture, il y a $46,7 \pm 2,5$ mg de calcium par

g de matière sèche. Cela signifie qu'à cette étape, 15 ± 15 % du calcium est contenue dans les carbonates.

À $t = 645$ h, le calcium a atteint sa concentration minimale d'environ $3 \mu\text{M}$.

Au cours de la croissance des cultures de C7, on observe une tendance à la diminution du nombre moyen de carbonates par cellule et de la taille moyenne des carbonates tandis que les carbonates présentent une proportion plus importante de magnésium au cours du temps.

Sur toute la durée du suivi des cultures, le nombre d'inclusions par cellule présente une forte variabilité, tandis que la taille des carbonates est moins variable. Ceci suggère que la taille maximale des carbonates intracellulaires pourrait être contrainte et que la formation de nouveaux carbonates ne compense pas la multiplication des cellules.

Pendant la croissance cellulaire dans le milieu BG-11 sous lumière continue et à 30°C , la souche *Gloeomargarita lithophora* C7 peut incorporer le calcium du milieu jusqu'à des concentrations externes aussi faibles que $2,75 \mu\text{M}$. Un calcul d'ordre de grandeur suggère que 18 % en moyenne de ce calcium incorporé se trouve dans les carbonates intracellulaires formés avec une forte variabilité selon les cellules. Il est à noter que ce chiffre doit être considéré comme un ordre de grandeur puisqu'une erreur sur la densité des carbonates et/ou la masse d'une cellule vont impacter cette estimation. Dans tous les cas, ces carbonates sont les zones les plus concentrées en calcium dans les cellules selon les analyses de MET. Les polyphosphates et le reste des cellules sont moins concentrés mais représentent potentiellement un volume plus grand par cellule.

2.2. Incorporation du calcium par la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425

Les carbonates de calcium intracellulaires ont été observés dans plusieurs espèces de cyanobactéries. Pour mieux caractériser et comprendre la formation de ces inclusions, il faut pouvoir déterminer ce qui est commun à ces différentes souches et aussi ce qui peut différer. Après avoir suivi et caractérisé les changements dans le milieu extracellulaire pendant la croissance de *G. lithophora* C7, nous avons suivi de la même façon la croissance d'une autre souche formant des carbonates intracellulaires. *Cyanothece* sp. PCC 7425 forme des carbonates sans localisation particulière dans son cytoplasme comme *G. lithophora* C7.

2.2.1. Étude des données macroscopiques des cultures

Cette souche a été cultivée en triplicats dans le milieu BG-11 dans un incubateur à 30°C sous agitation et lumière continue. Comme pour C7, la DO à 730 nm, le pH et la concentration en calcium par colorimétrie dans le milieu sont suivis presque tous les jours. La Figure 2.16 présente ces résultats. À certains instants, des analyses

complémentaires ont été faites par ICP-AES, chromatographie ionique ainsi que des mesures de l'alcalinité.

Dans les trois réplicats, la concentration en calcium diminue en dessous de la limite de détection de la mesure par colorimétrie qui est de 20 μM (Matériel et Méthodes § 2.1.1), atteint après environ 400 h d'incubation. La DO des trois réplicats continue d'augmenter après que le calcium soit au plus bas. Le pH quant à lui monte rapidement jusqu'à une valeur entre 9 et 9,5 contrairement à la souche C7 pour laquelle le pH augmentait lentement. On remarque qu'entre 125 et 200 heures, la DO stagne voire diminue : cette phase de latence intermédiaire est probablement due aux changements de température successifs survenus pendant les prélèvements ; c'est pourquoi les points de prélèvement sont ensuite plus espacés dans le temps. Cette souche pourrait être plus sensible aux changements de température. Une fois la croissance reprise, la concentration en calcium diminue et le pH remonte à un plateau entre 9 et 9,5.

Cinq à six prélèvements plus importants (8 mL) sont fait pendant la croissance de ces cultures. Pour ces prélèvements, on a déterminé la concentration en ions bicarbonates, en phosphore, et mesuré des concentrations en calcium par ICP-AES. Les valeurs sont présentées en Figure 2.17. Pour les trois réplicats, les concentrations en calcium suivent bien les mêmes tendances. Le phosphore diminue et le bicarbonate augmente de façon continue. Ni l'un ni l'autre ne semblent affectés par la phase de latence intermédiaire observée. Le calcium en solution diminue jusqu'à une concentration d'environ 5,9 μM , soit plus de deux fois plus que pour la souche *G. lithophora* C7. Une autre différence est la concentration du phosphore qui, contrairement aux cultures de C7, reste toujours élevée ($> 100 \mu\text{M}$) et continue à diminuer quand le calcium n'est plus incorporé. La concentration en phosphore diminue moins que dans les cultures de C7, pourtant le calcium est également incorporé dans sa quasi-totalité.

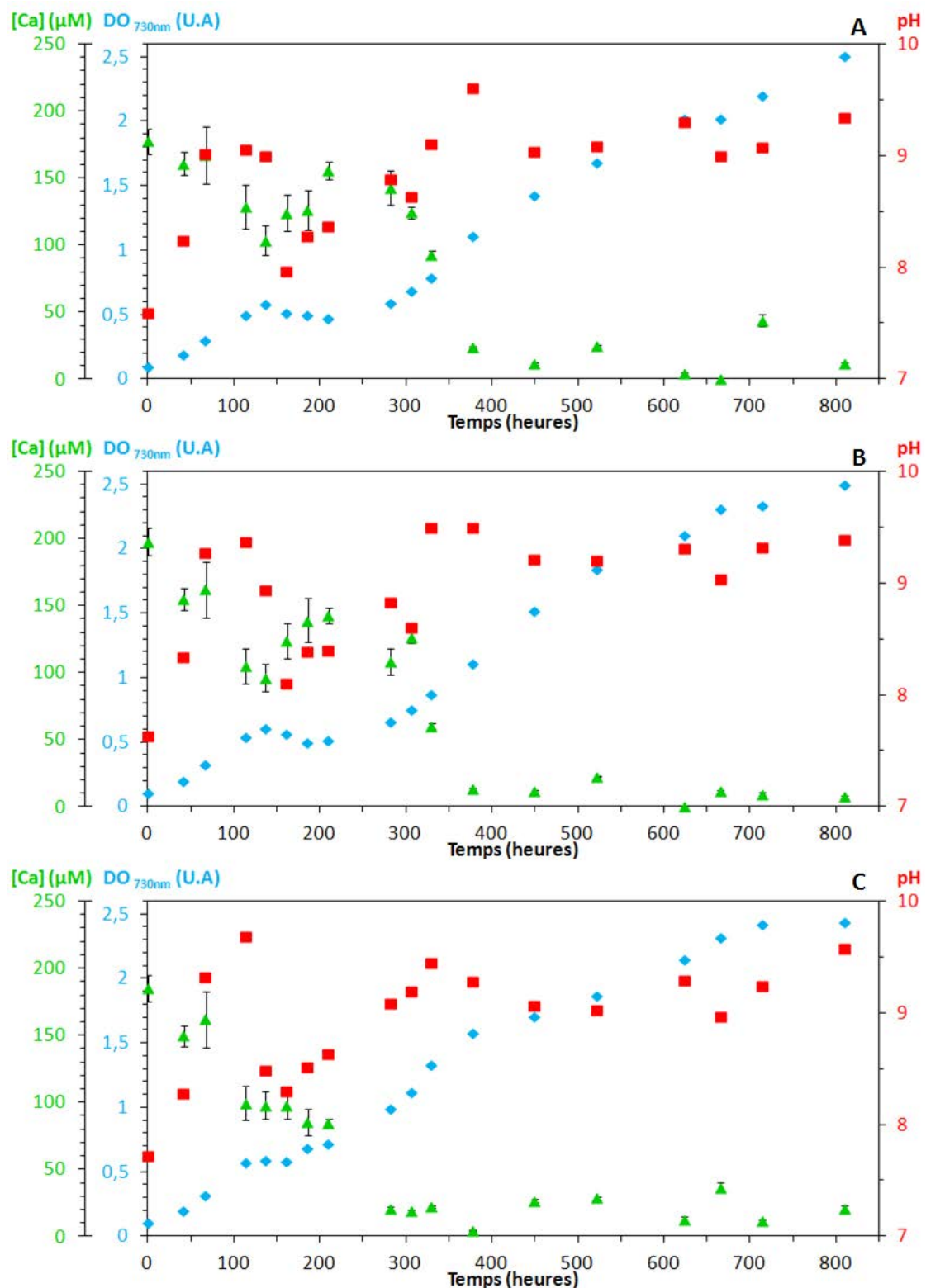


Figure 2.16 : Cultures de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 30 °C. DO, pH et concentration en calcium mesurée par colorimétrie dans le milieu. Les graphiques A, B et C correspondent à 3 réplicats. Les erreurs liées aux mesures du pH et de la DO sont constantes (0,1 pour le pH et 0,005 pour la DO).

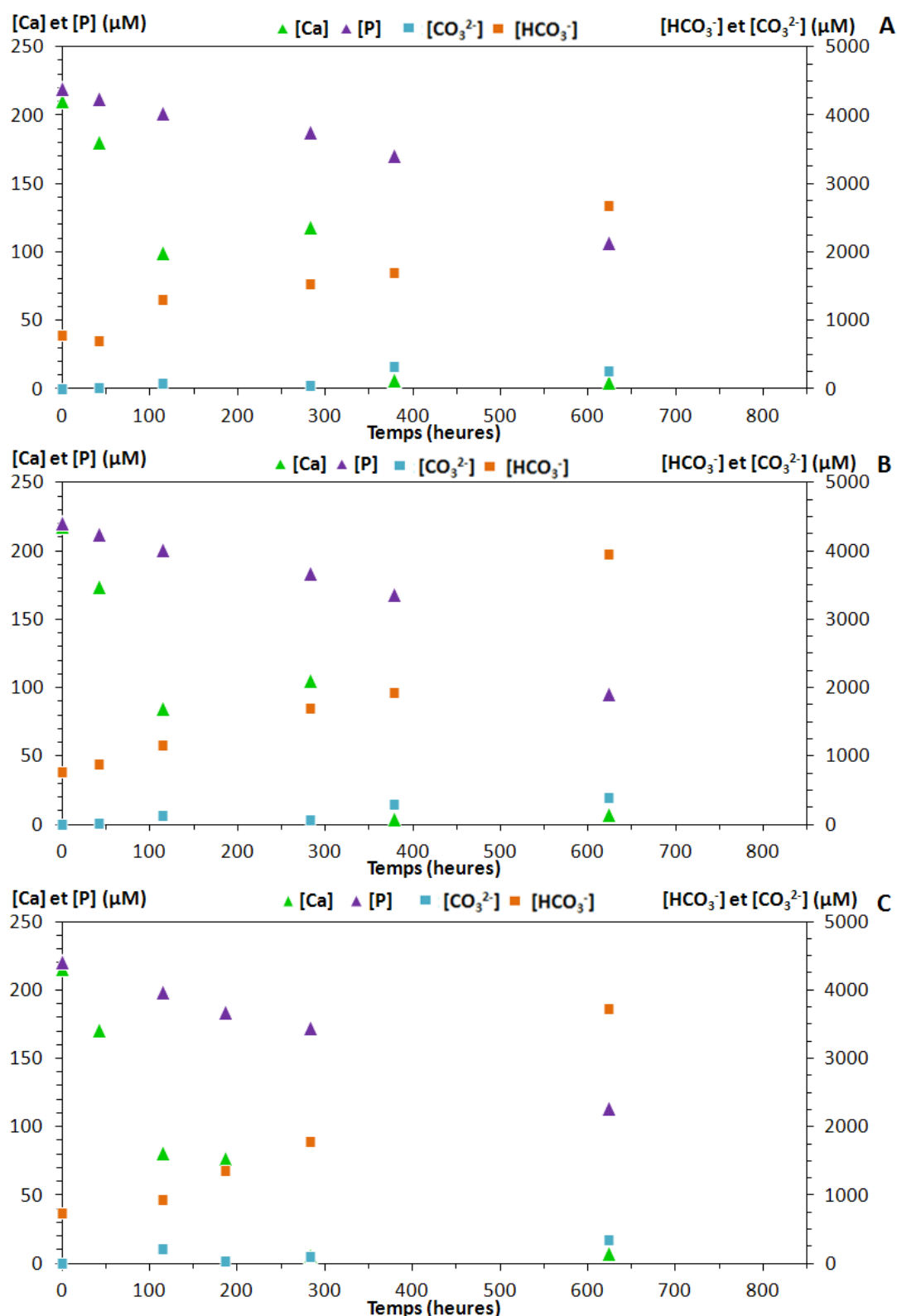


Figure 2.17 : Cultures de *Cyanothece* sp. PCC 7425 dans un milieu BG-11. Concentrations en calcium, phosphore, hydrogénocarbonate et carbonate dans le milieu de culture. Le Ca est mesuré par ICP-AES, le P par colorimétrie en flux continu et le HCO_3^- et le CO_3^{2-} sont calculées à l'aide des mesures d'alcalinité, du pH et des autres éléments contribuant à l'alcalinité par colorimétrie, chromatographie ionique et ICP-AES. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

Avec les différents éléments mesurés on peut déterminer des indices de saturation du milieu de culture par rapport à différentes phases contenant du calcium. Ces indices, calculés pour différents temps d'une des cultures, sont donnés dans le Tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Indices de saturation des phases contenant du calcium dans une culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425 dans un milieu BG-11 à 30 °C sous lumière continue.

Temps (h)	0	114	186	282	623
ACC	-2,43	0,202	-1,336	-1,49	-1,133
Anhydrite	-3,33	-4,75	-3,861	-5,202	-5,496
Aragonite	-1,746	0,885	-0,653	-0,806	-0,449
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am1)	-3,566	-3,664	-3,49	-6,275	-6,431
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am2)	-0,837	-0,934	-0,76	-3,545	-3,701
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (beta)	-0,574	-0,671	-0,497	-3,283	-3,438
Ca ₄ H(PO ₄) ₃ :3H ₂ O(s)	-1,476	-2,938	-1,908	-6,01	-6,421
CaCO ₃ xH ₂ O(s)	-2,929	-0,297	-1,835	-1,989	-1,632
CaHPO ₄ (s)	-1,206	-2,571	-1,715	-3,031	-3,287
CaHPO ₄ :2H ₂ O(s)	-1,463	-2,828	-1,971	-3,288	-3,544
Calcite	-1,606	1,026	-0,512	-0,666	-0,309
CaMoO ₄ (s)	-2,132	-3,51	-2,609	-3,906	-3,981
Dolomite (disordered)	-3,378	2,487	-0,79	0,079	0,699
Dolomite (ordered)	-2,848	3,017	-0,26	0,609	1,229
Ettringite	-26,732	-26,931	-26,525	-32,187	-32,227
FCO ₃ -Apatite	11,865	13,232	12,736	4,676	4,993
Fluorite	-5,348	-6,843	-5,977	-7,259	-7,043
Gypsum	-3,103	-4,524	-3,635	-4,976	-5,27
Huntite	-9,645	2,686	-4,068	-1,154	-0,01
Hydroxyapatite	6,049	7,218	6,711	2,455	2,401
Lime	-20,694	-18,062	-19,6	-19,754	-19,397
Portlandite	-10,887	-8,256	-9,794	-9,947	-9,59
Powellite	-2,081	-3,459	-2,558	-3,855	-3,93
Vaterite	-2,159	0,472	-1,066	-1,219	-0,862

Il y a des phases vis-à-vis desquelles le milieu est sursaturé à certains instants. Le fait que le milieu devienne par la suite sous-saturé et ne se maintienne pas à l'équilibre avec ces phases, montre que ces phases ne contrôlent pas la concentration en calcium en solution. On remarque notamment qu'à $t = 144$ h, le milieu est sursaturé pour plusieurs phases de carbonates de calcium. Sur toute la durée de l'observation, le milieu est sursaturé pour l'hydroxyapatite.

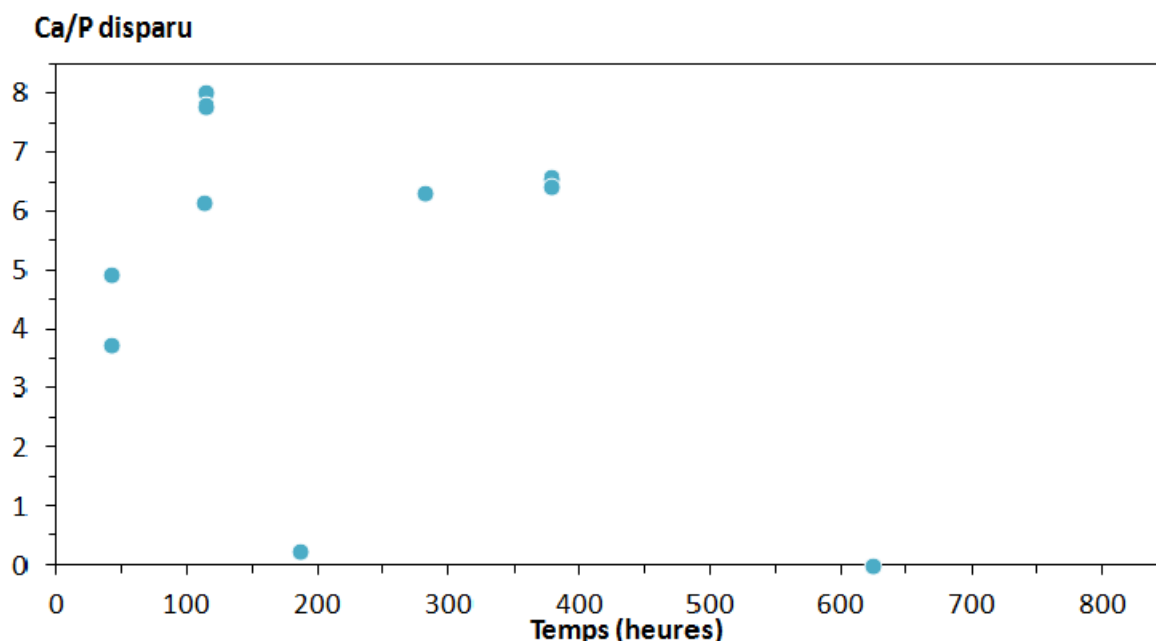


Figure 2.18 : Rapport de la diminution du Ca sur celle du P dans la solution de trois réplicats de culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425. La concentration en calcium a été mesurée par ICP-AES et le phosphore par colorimétrie en flux continu.

Pour vérifier que la diminution de la concentration en calcium n'est pas imputée à la précipitation extracellulaire de phosphate de calcium, les rapports des quantités de calcium et de phosphore disparus de la solution en fonction du temps sont reportés dans la Figure 2.18. Le rapport Ca/P est entre 3,5 et 8 pour les intervalles pendant lesquels le calcium diminue ce qui est bien supérieur au rapport Ca/P des phases de phosphate de calcium connues (Tableau 2.2). Ceci suggère que la diminution du calcium et du phosphore ne sont pas liés majoritairement à la précipitation extracellulaire de phosphates de calcium. Si la diminution de phosphore est imputée à la formation de polyphosphates dans les cellules, on constate qu'elle est moins intense dans cette souche par rapport à la formation de carbonates comparée à C7.

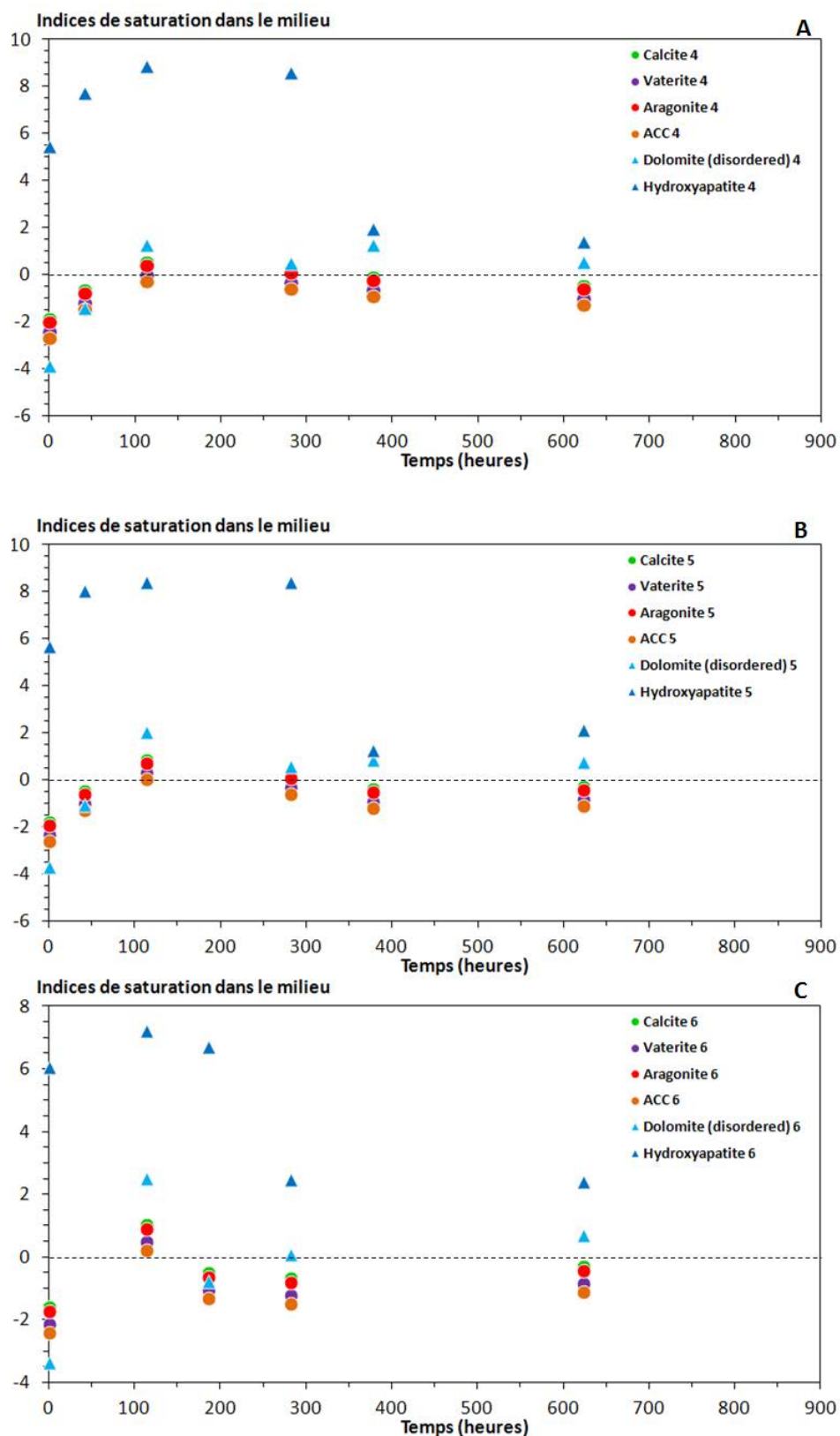


Figure 2.19 : Culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 30 °C. Indices de saturation de phase contenant du calcium au cours du temps. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

La Figure 2.19 présente les indices de saturation des solutions vis à vis des phases de carbonates de calcium ainsi que l'hydroxyapatite et la dolomite, durant la croissance de culture en triplicatas.

Les changements de concentration en solution des différentes espèces intervenant dans ces solides étant comparables dans les réplicats de culture, les indices de saturation suivent les mêmes évolutions au cours du temps. Il faut souligner que le fait que les solutions sont sursaturées par rapport à l'hydroxyapatite n'implique pas forcément qu'il y a une précipitation effective d'hydroxyapatite.

Les observations en microscopie électronique sont présentées ci-après pour vérifier s'il y a ou non précipitation extracellulaire de phases contenant du calcium.

Le logarithme népérien de la DO est tracé en fonction du temps à la Figure 2.20. Au départ la croissance est rapide avec un temps de génération d'environ 50 h. Après environ 150 h, la croissance est stoppée, la mortalité dépasse la natalité. Vers 200-250 h, la croissance reprend avec une vitesse plus lente (temps de génération ≈ 140 h) et stagne vers 450 h, soit environ 50 h après la fin de la phase de diminution du calcium dans le milieu extracellulaire. La croissance de cette souche est plus rapide que celle de la souche C7 dans les mêmes conditions.

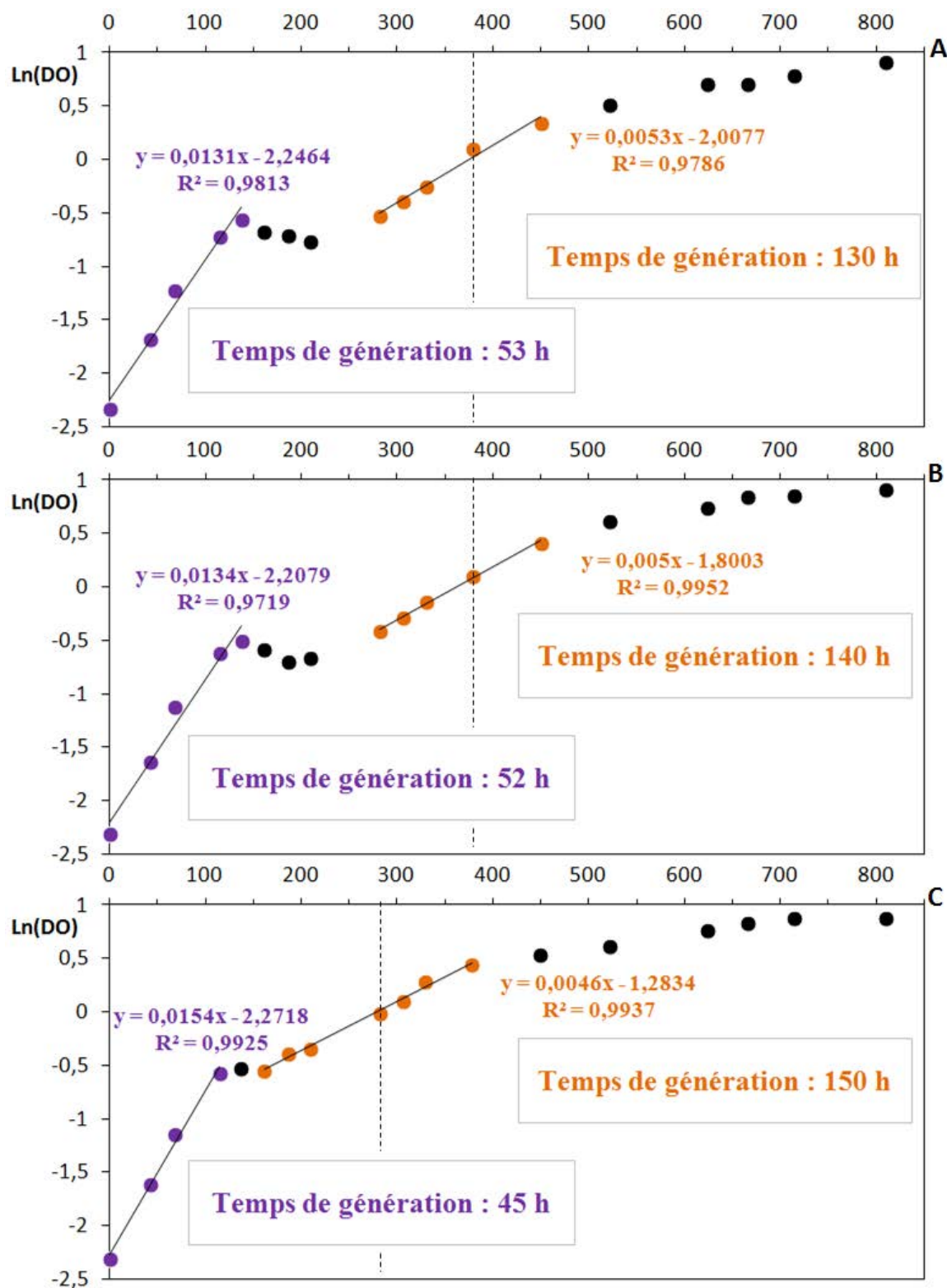


Figure 2.20: Culture de *Cyanosyce* sp. PCC 7425 dans le milieu BG-11. Logarithme népérien de la DO durant la croissance. Les graphiques A, B et C correspondent aux trois réplicats. Les lignes en tirets représentent le premier point pour le lequel la concentration en calcium a atteint sa valeur minimale.

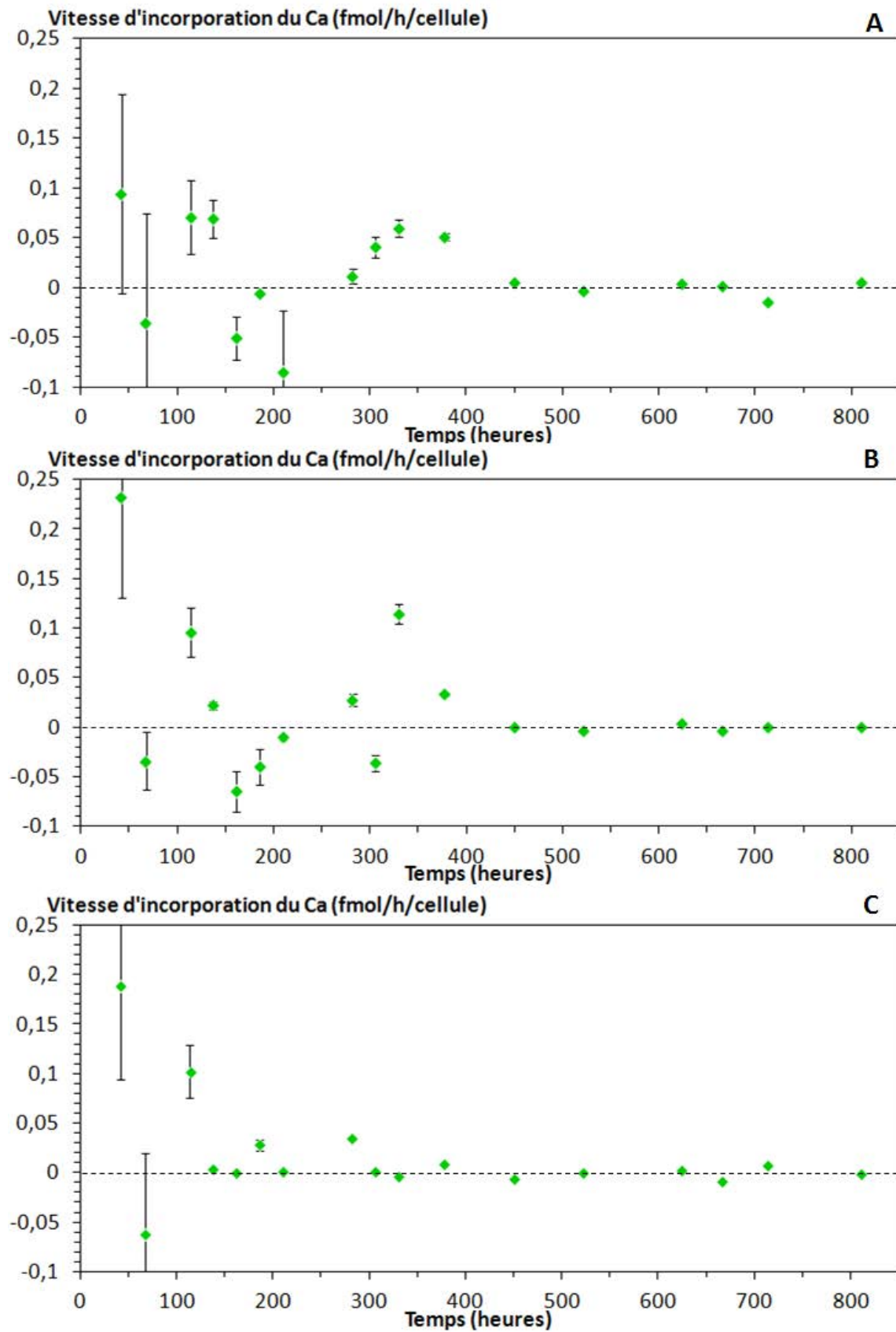


Figure 2.21 : Cultures de *Cyanosethece* sp. PCC 7425 dans le milieu BG-11. Vitesses d'incorporation du calcium mesuré par colorimétrie. Les graphiques A, B, et C correspondent aux trois réplicats.

Les vitesses d'incorporation du calcium sont présentées en fonction de l'âge des cultures en Figure 2.21. Dans les trois réplicats, la vitesse initiale est élevée (0,09 ; 0,23 et 0,19 fmol/h/cellule). Cette vitesse diminue ensuite et devient parfois apparemment négative lors de la phase de latence intermédiaire observée pour ces trois cultures : pendant cette phase, la densité cellulaire diminue légèrement et du calcium est libéré dans la solution. Ensuite, la vitesse d'incorporation augmente significativement pour deux des trois réplicats (0,06 et 0,11 fmol/h/cellule). La Figure 2.22 présente les vitesses d'incorporation du calcium en fonction de la concentration extracellulaire en calcium pour les trois réplicats. On peut voir, comme pour la souche *Gloeomargarita lithophora* C7, que cette vitesse augmente avec la concentration en calcium extracellulaire. De nouveau, la concentration en calcium extracellulaire diminue en même temps que la DO augmente.

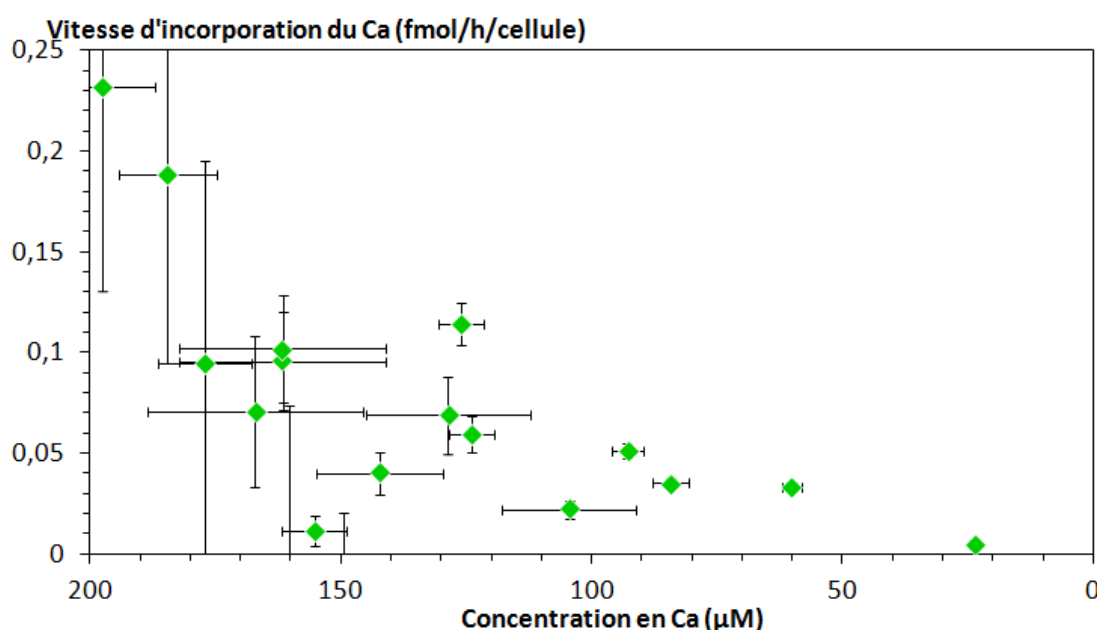


Figure 2.22 : Cultures de *Cyanotheca* sp. PCC 7425. Vitesses d'incorporation du calcium en fonction de sa concentration mesurée par colorimétrie durant la croissance des trois réplicats. Seules les valeurs correspondant aux phases de décroissance sont prises en compte.

La Figure 2.23 montre les quantités de calcium accumulées par masse de matière sèche. Cette quantité augmente rapidement au début jusqu'à environ 20 mg / g de matière sèche. La quantité de calcium par masse cellulaire semble rester constante jusqu'à 150 h. Quand la croissance est stoppée temporairement, la quantité de calcium par cellule semble diminuer légèrement pour au moins un des réplicats. Après que la croissance a repris, la quantité de calcium remonte jusqu'à des valeurs proches de ce qui est observé en début de culture. Quand le calcium dans le milieu externe atteint une concentration de l'ordre de 5,9 µM, puisque les cellules continuent de se multiplier, la quantité

massique de calcium par masse de matière sèche diminue progressivement. Les quantités de calcium incorporé sont comparables à celles calculées pour la souche C7.

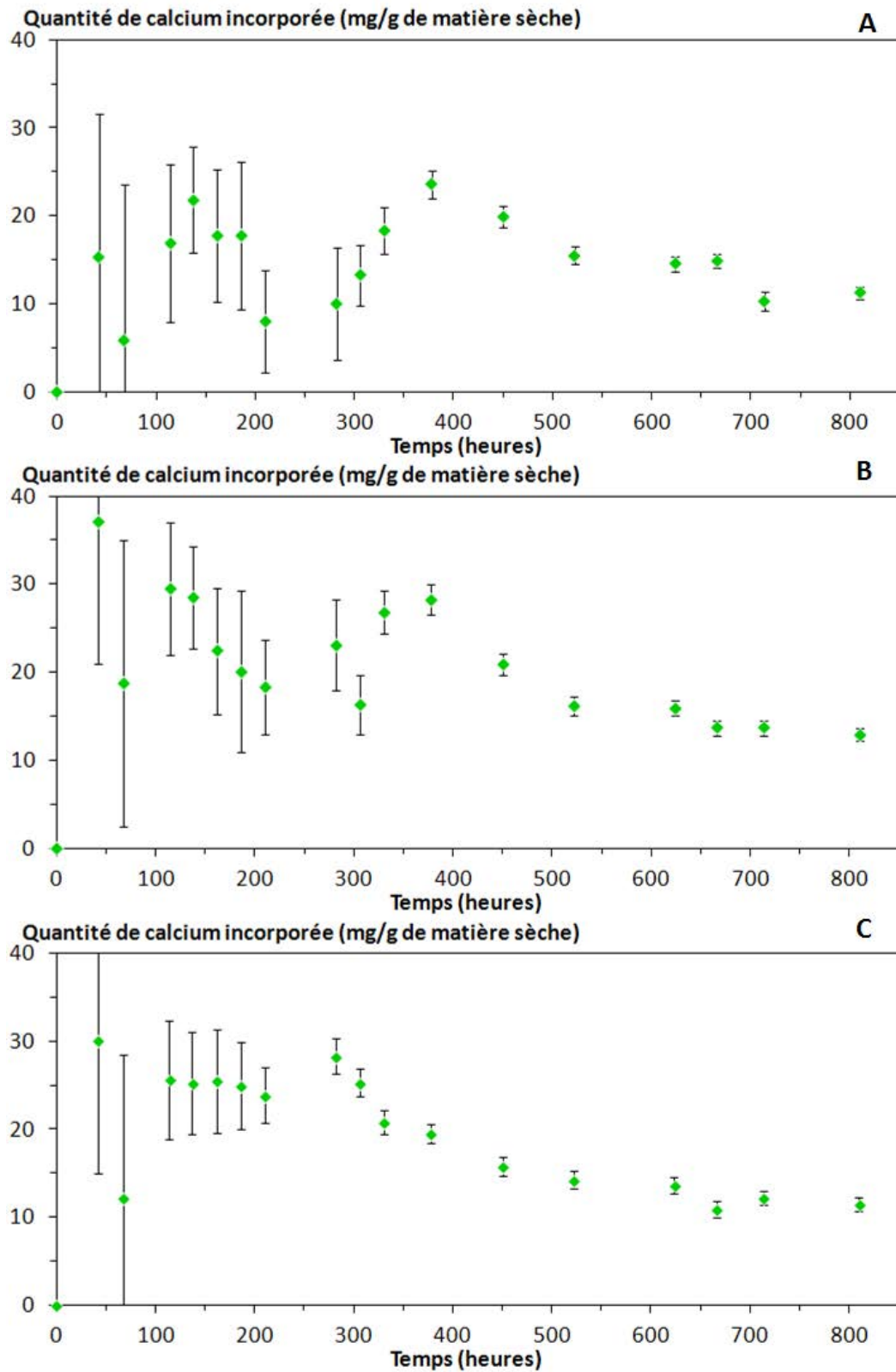


Figure 2.23 : Cultures de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 dans le milieu BG-11. Quantités massiques de calcium incorporé mesurées par colorimétrie. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

2.2.2. Étude microscopique des carbonates intracellulaires

Des cellules ont été observées en microscopie électronique en transmission à cinq instants de la culture (Figure 2.24).

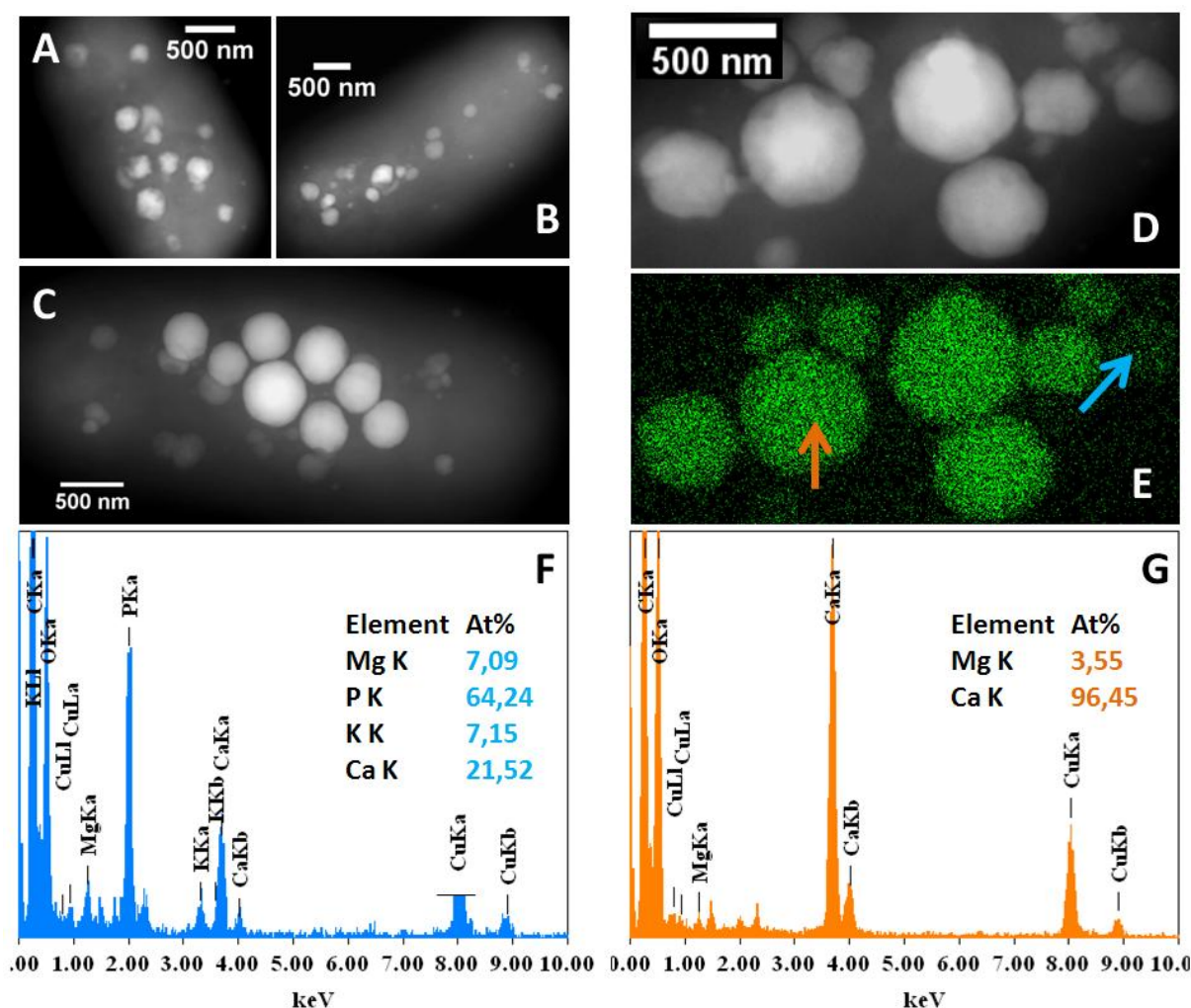


Figure 2.24 : Culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425 à $t=0$ h dans un milieu BG-11. Les cellules contiennent en moyenne 16 mg de calcium par g de matière sèche. (A), (B), (C) et (D) Images STEM en mode HAADF de cellules contenant des carbonates. (E) Cartographie EDXS du calcium. (F) Spectre EDXS de la particule indiquée par la flèche bleue. (G) Spectre de la particule indiquée par la flèche orange.

À $t=0$ h, les cyanobactéries contiennent des carbonates de calcium produits durant la pré-culture. Comme dans C7, deux types de particules sont présents dans ces cellules : des carbonates de calcium contenant un peu de magnésium (spectre orange) et des polyphosphates contenant du magnésium, du potassium et du calcium (spectre bleu). Les carbonates contiennent $4,0 \pm 2,2$ % de magnésium, soit deux fois moins que les carbonates de *G. lithophora* C7 (Figure 2.24).

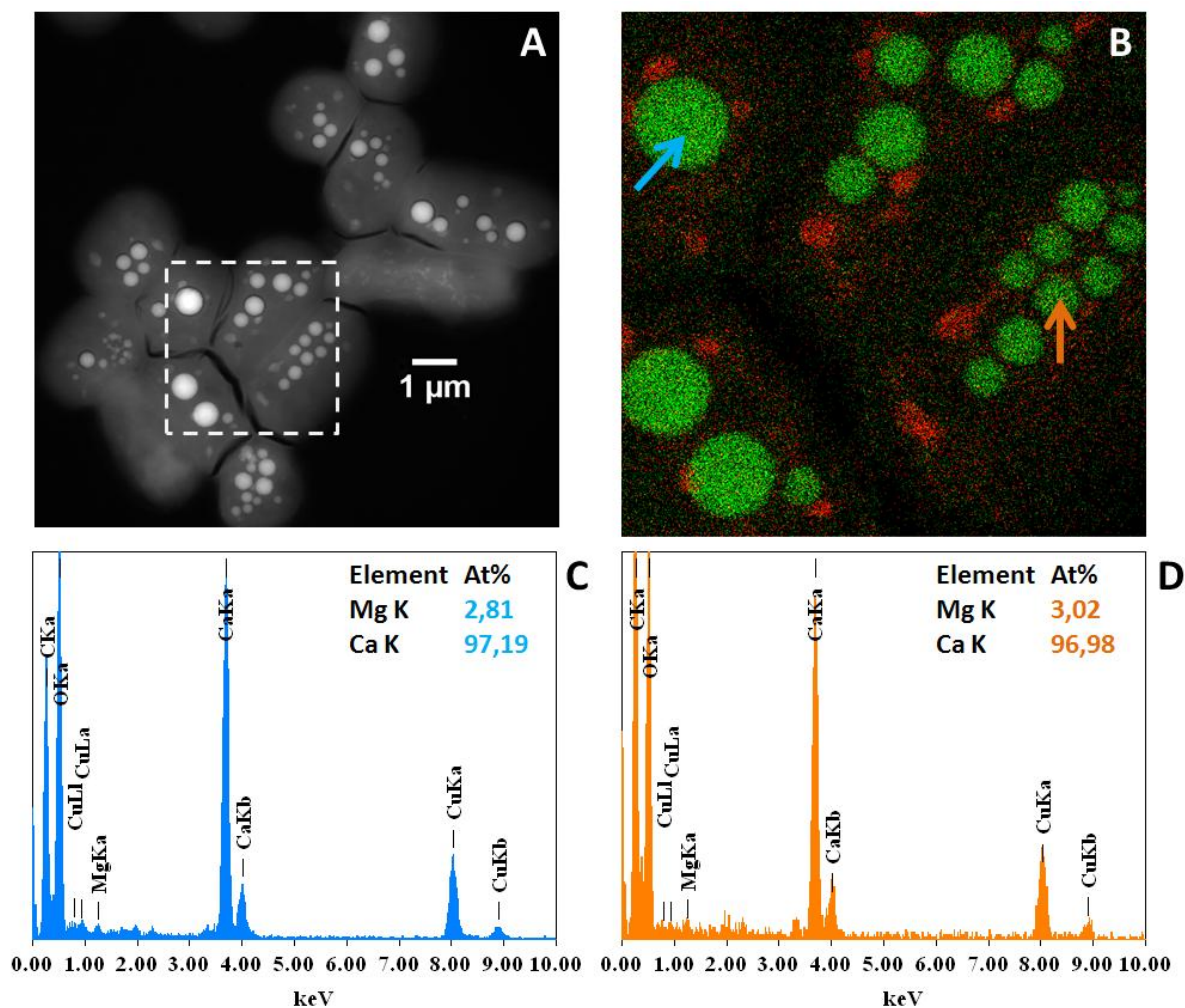


Figure 2.25 : Culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425 à $t = 144$ h. (A) Image STEM HAADF. (B) Cartographie EDXS du calcium (vert) et du phosphore (rouge) d'inclusions de plusieurs cellules. (C) Spectre EDXS de la particule indiquée par la flèche bleue. (D) Spectre de la particule indiquée par la flèche orange.

À $t = 144$ h, certaines cellules ne contiennent aucune inclusion, d'autres contiennent une ou deux inclusions de plus de 500 nm de diamètre (le carbonate correspondant au spectre Figure 2.25-C mesure 650 nm de diamètre) et d'autres contiennent une dizaine de particules de carbonates de taille inférieure (Figure 2.25).

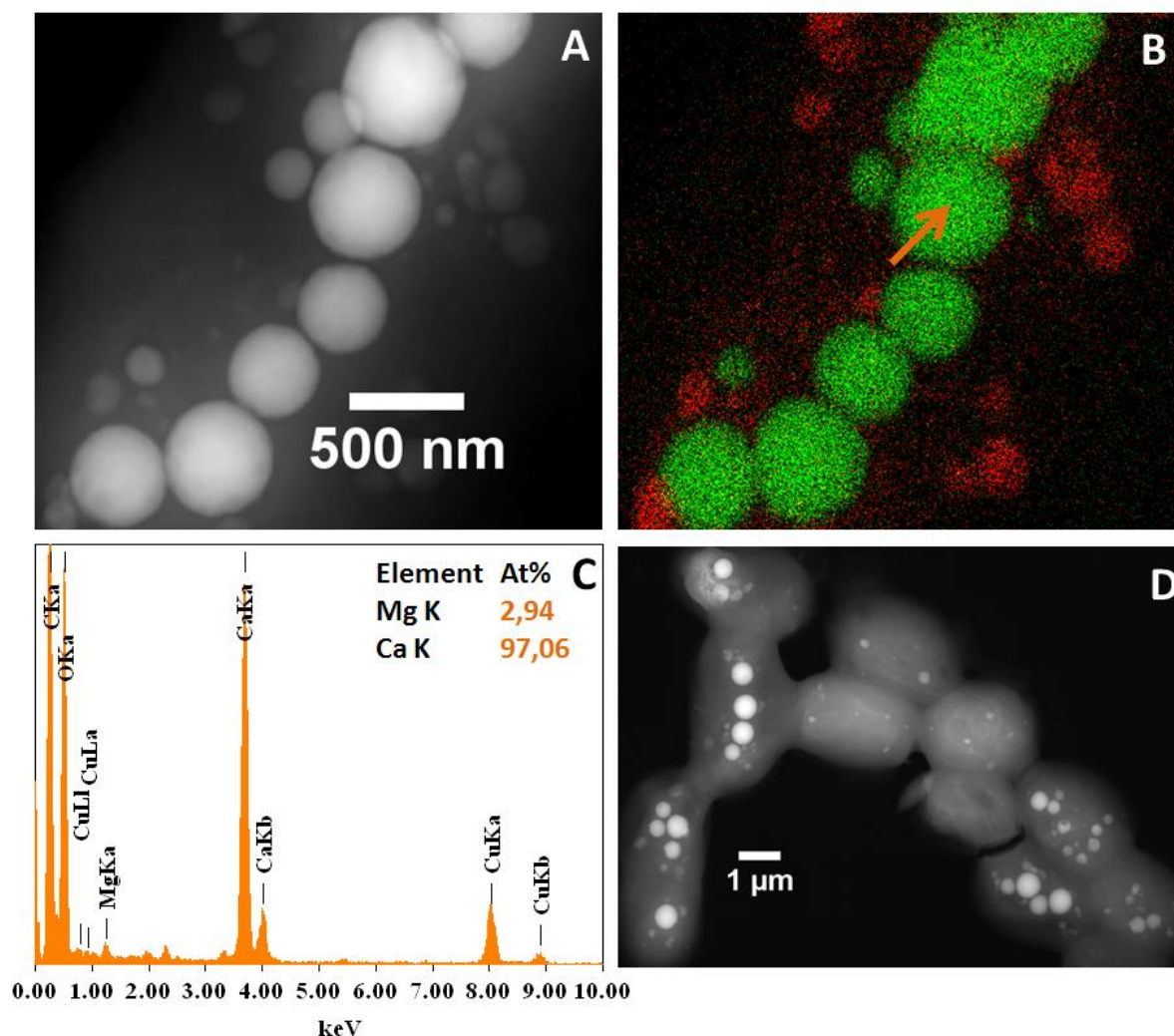


Figure 2.26 : Culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425 à $t = 623$ h. (A) Images en STEM en mode HAADF d'une cyanobactérie. (B) Cartographie EDXS correspondante du calcium (vert) et du phosphore (rouge) d'inclusions de plusieurs cellules. (C) Spectre EDXS de la particule indiquée par la flèche orange. (D) Image STEM de plusieurs cyanobactéries.

À $t = 623$ h, la concentration de calcium dans le milieu a atteint la valeur de $5,9 \mu\text{M}$ qui reste ensuite constante dans le milieu (Figure 2.26). On peut voir que, comme aux autres instants de prélèvement, toutes les cellules ne contiennent pas de carbonates de calcium. Cette hétérogénéité implique un écart-type supérieur important dans le calcul du volume de carbonate par cellule ($0,08 \pm 0,12 \mu\text{m}^3$). La Figure 2.27 présente la distribution des mesures. Ces carbonates de calcium contiennent $3,15 \pm 0,87 \%$ atomique de magnésium.

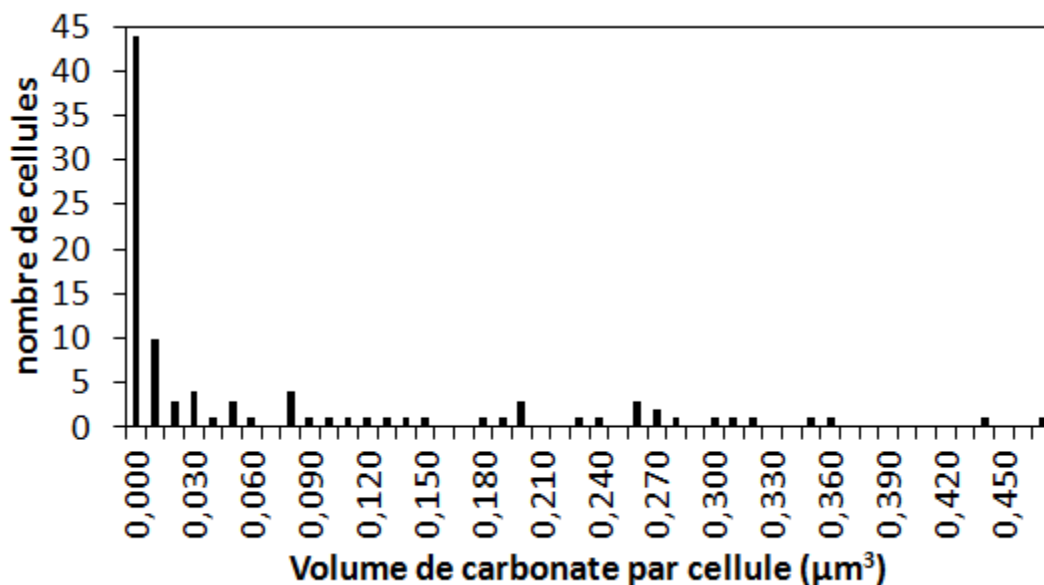


Figure 2.27 : Culture de *Cyanoshece* sp. PCC 7425 dans du BG-11 à $t = 623$ h. Distribution du volume de carbonate par cellules mesuré en STEM. La moyenne est de $0,008 \mu\text{m}^3$, 36 % des cellules sont vides.

On remarque, dans les observations STEM à différents instants que les particules de phosphates sont plus petites dans PCC 7425 que dans C7. L'analyse des solutions indiquait aussi que PCC 7425 incorpore moins de phosphore que C7.

Tableau 2.5 : Données MET de la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425. *données venant de 2 des 3 répliqués.

<i>Cyanothece</i> sp. PCC7425										
temps (h)	nombre mesuré		MET			diamètre des inclusions			volume d'inclusion par cellule	
	cellules	inclusions	nombre d'inclusion par cellule			(nm)			(μm ³)	
0	16	82	5,1	±	4,3	277	±	126	0,10	± 0,10
42	47	145	3,1	±	2,3	279	±	139	0,064	± 0,058
114	132	555	4,2	±	2,3	317	±	122	0,104	± 0,074
282	85	316	3,7	±	3,8	282	±	109	0,066	± 0,074
623	97	280	2,9	±	3,2	300	±	151	0,08	± 0,12
temps (h)	EDX		quantité de			ICP-AES (3 répliqués)			calcium dans les carbonates	
	substitution du magnésium (%)		calcium dans les carbonates (mg/g mat. sèche)			calcium total dans les cellules (mg/g mat. sèche)			calcium dans les carbonates (%)	
0	4,0	± 2,2	9	±	10	15			57	± 68
42	4,4	± 2,2	5,7	±	5,9	42,3	±	4,9	14	± 14
114	3,0	± 1,7	9,5	±	8,5	42,9	±	1,5	22	± 20
282	4,8	± 2,2	5,8	±	7,1	30,1*	±	1,2*	19*	± 22*
623	3,15	± 0,87	7	±	11	17,86*	±	0,14*	38*	± 59*

Le Tableau 2.5 présente les données tirées des observations en microscopie électronique en transmission faites à cinq instants de prélèvement.

À $t = 0$ h, chaque cellule contient $5,1 \pm 4,3$ inclusions de carbonate de calcium avec un diamètre de 277 ± 126 nm.

Le nombre moyen de carbonates par cellule, leur taille et leur composition ne varient pas pendant la croissance de la culture. La quantité totale de calcium dans les cellules diminue entre 282 et 623 heures car les cellules continuent à se multiplier mais n'incorporent plus de calcium depuis le milieu. Pourtant la quantité de carbonate moyen cellulaire et la composition de ces carbonates ne semble pas changer. Les cyanobactéries forment toujours des carbonates intracellulaires avec le calcium qu'elles contiennent. De ce fait, la proportion du calcium cellulaire contenu dans les carbonates augmente.

La souche PCC 7425 semble contenir moins d'inclusions de carbonate de calcium que C7 mais ceux-ci sont plus volumineux.

2.3. Incorporation du calcium par la souche *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

2.3.1. Étude des données macroscopiques des cultures

La souche *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 forme des carbonates intracellulaires localisés au niveau des pôles de la cellule, contrairement aux deux souches précédentes. C'est une souche thermophile poussant à 45 °C. Elle a été cultivée en triplicats dans le milieu BG-11 dans un incubateur à 45 °C sans agitation et sous lumière continue (5-10 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$) avec 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de kanamycine dans les cultures. La kanamycine est un antibiotique auquel la souche BP-1 est résistante. L'ajout de cet antibiotique permet en revanche de limiter la croissance d'éventuelles espèces contaminantes. Comme pour les expériences précédentes, la DO à 730 nm, le pH et la concentration en calcium par colorimétrie ont été suivis presque tous les jours. La Figure 2.28 présente ces résultats. À certains instants, 8 mL des cultures ont été prélevés et des analyses ont été effectuées par ICP-AES, chromatographie ionique, mesures de l'alcalinité et colorimétrie à flux continu des formes phosphatées et azotées. La Figure 2.29 montre la concentration en calcium mesurée par ICP-AES, le phosphore total ainsi que la concentration en ions bicarbonates dans le milieu en fonction du temps.

Les trois réplicats ont un temps de latence identique (100-150 h). Cette phase dépend de l'état de la pré-culture utilisée comme inoculum. Comme pour les autres souches, nous avons utilisé la même pré-culture pour inoculer les triplicats. Durant cette phase, le pH augmente et la concentration en calcium stagne pour deux des réplicats mais diminue légèrement pour le troisième. Dans une seconde étape, la DO augmente, la concentration en calcium diminue et le pH atteint un plateau entre 9,5 et 10 unités. Après 330 h d'incubation, la diminution de la concentration en calcium s'arrête et la croissance de la culture continue jusqu'à un plateau ($\sim 1,75$ de DO) vers 550-600 h. L'analyse en ICP-AES de la concentration en calcium (Figure 2.29) montre que cette souche incorpore du calcium jusqu'à ce que la concentration résiduelle dans la solution atteigne 12,7 μM en moyenne soit une concentration deux fois plus grande que pour la souche PCC 7425. Le calcul de la concentration en ions bicarbonates montre qu'elle diminue au début des cultures (phase de latence) puis stagne vers 500 μM et augmente jusqu'à plus de 2 mM. La concentration en phosphore diminue puis augmente dans les trois réplicats. Ensuite elle diminue plus lentement. Le dernier instant mesuré montre des concentrations supérieures à 150 μM . Dans ces cultures, les quantités de phosphore diminuent beaucoup moins que dans les cultures de C7 et de PCC 7425 ; pourtant BP-1 incorpore la même quantité de calcium.

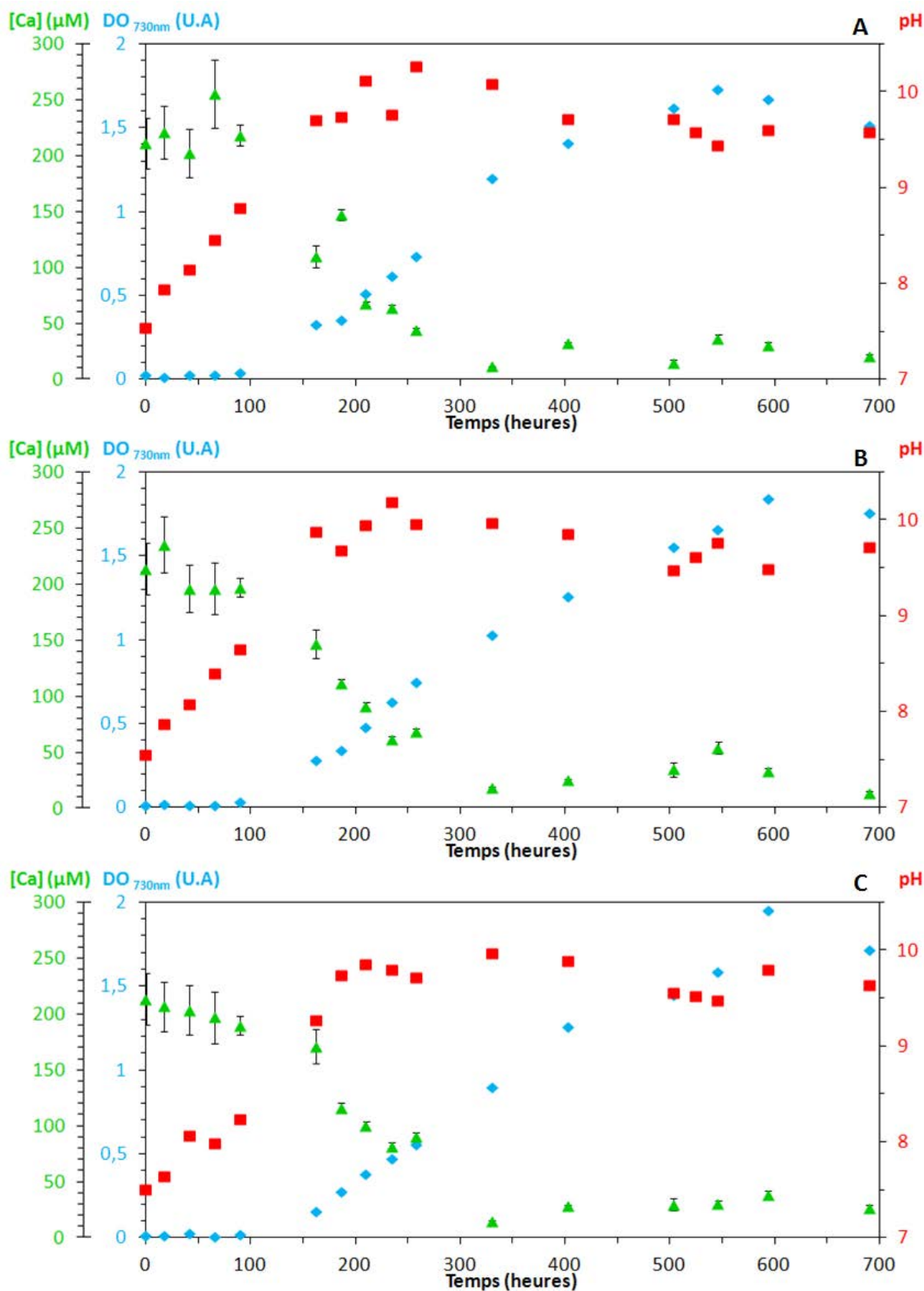


Figure 2.28 : Culture de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 45 °C. Suivi de la DO, du pH et de la concentration en calcium mesurée par colorimétrie. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

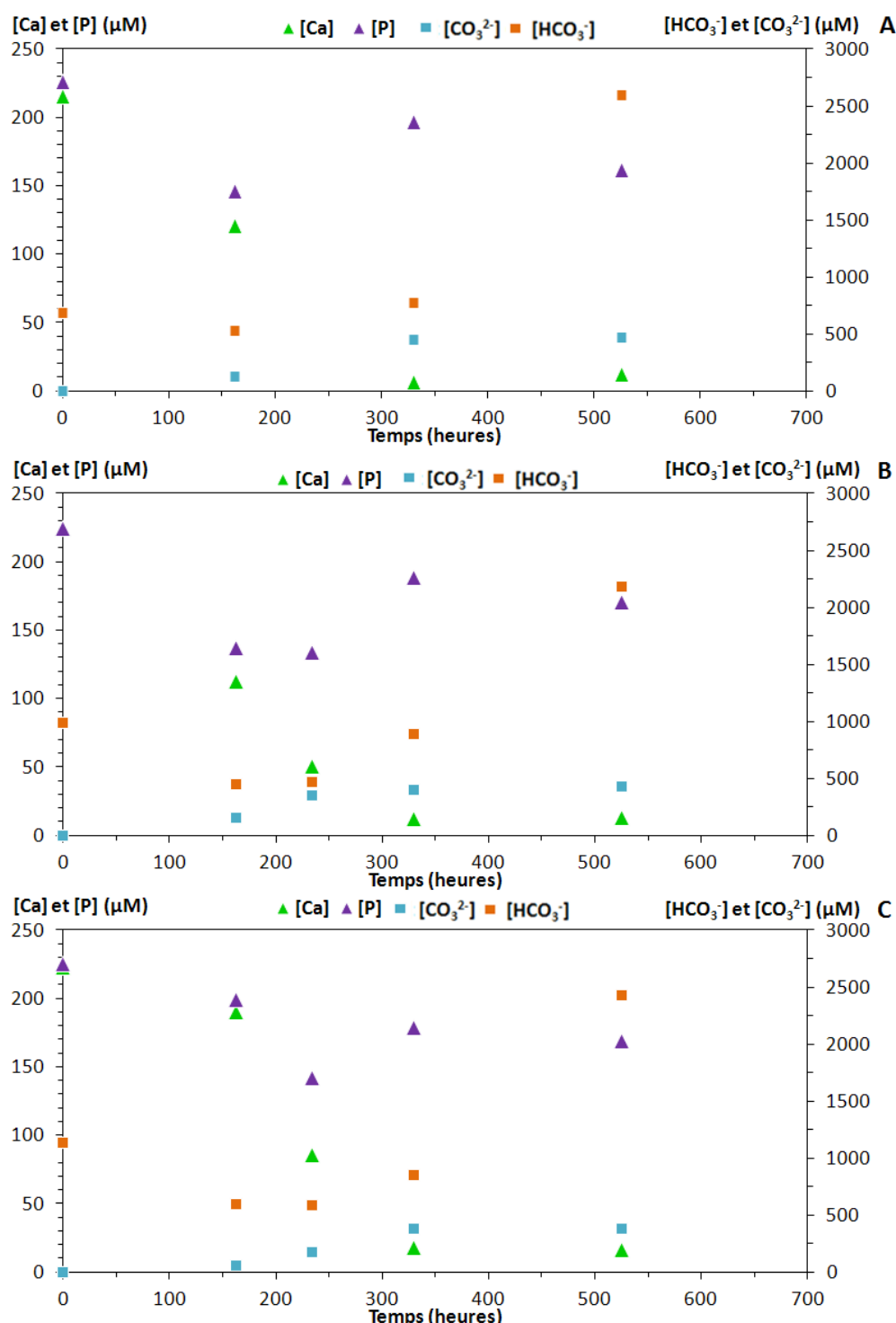


Figure 2.29 : Culture de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Concentrations en calcium, phosphore, carbonate et hydrogénocarbonate dans le milieu de culture d'une au cours du temps. La concentration en calcium est mesurée par ICP-AES, le phosphore par colorimétrie en flux continu et les ions carbonates et hydrogénocarbonates par calcul, avec les mesures d'alcalinité par colorimétrie et des espèces entrant en compte dans l'alcalinité par ICP-AES, colorimétrie en flux continu et chromatographie ionique. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

La Figure 2.30 montre l'évolution du rapport Ca/P de la fraction ségrégée au cours du temps dans les cultures. Ce rapport est extrêmement variable avec des valeurs très élevées et d'autres négatives. Ces observations suggèrent que la diminution du calcium n'est pas due à la précipitation extracellulaire de phosphate de calcium.

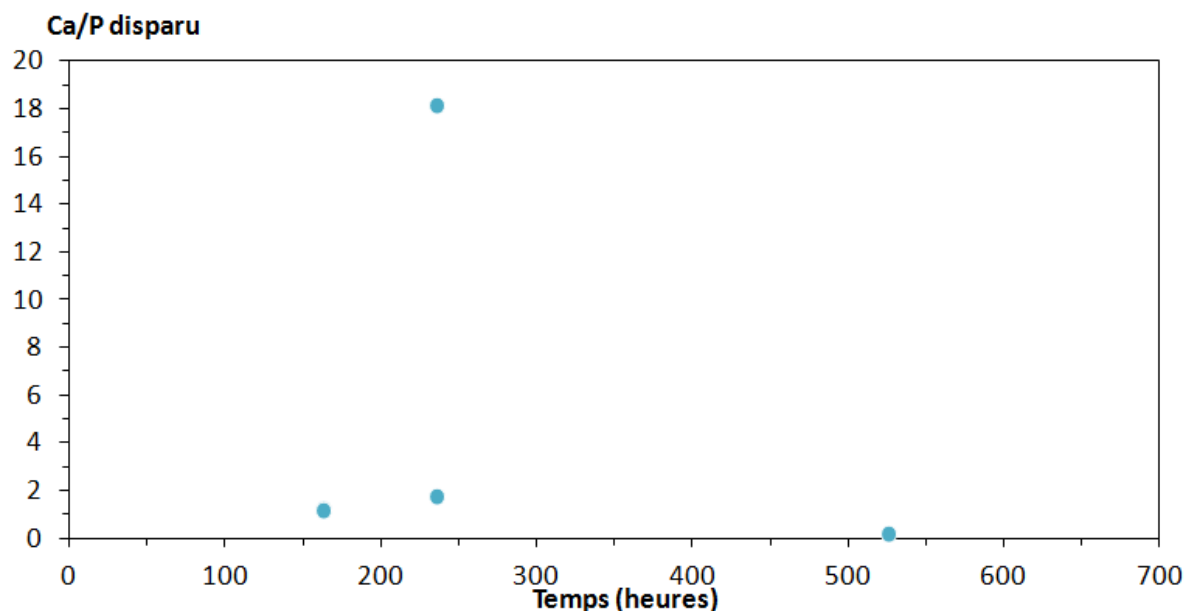


Figure 2.30 : Culture de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Rapports Ca/P de la fraction ségrégée du milieu de culture dans les trois réplicats. La concentration en calcium est mesurée par ICP-AES et le phosphore par colorimétrie en flux continu.

Les saturations des milieux de culture pour différentes phases contenant du calcium à différents instants sont calculées avec le logiciel de spéciation chimique Visual MINTEQ. Les résultats pour un des réplicats sont donnés dans le Tableau 2.6.

Le milieu extracellulaire de la culture devient sursaturé pour plusieurs phases notamment les carbonates de calcium comme la calcite, l'aragonite et, pendant un temps, la vaterite et l'amorphe. Ces indices de saturation sont supérieurs à ce qui a été vu dans les cultures de *Gloeomargarita lithophora* C7 et *Cyanothece* sp. PCC 7425. Les carbonates sont des minéraux dont la solubilité diminue avec la température. Les calculs de saturation sont faits pour 45 °C car c'est la température de culture de la souche BP-1. La température est un facteur qui explique de plus grandes saturations dans le milieu de vie de cette souche. Les indices de saturation de quelques phases sont présentés pour les trois réplicats en Figure 2.31: les tendances décrites dans le Tableau 2.6 se retrouvent pour les deux autres réplicats.

Tableau 2.6 : Indices de saturation des phases contenant du calcium dans une culture de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

Temps (h)	0	162	234,5	330	525
ACC	-2,73	0,34	0,268	-0,375	-0,577
Anhydrite	-3,207	-3,719	-4,982	-6,114	-5,368
Aragonite	-2,073	0,997	0,925	0,282	0,08
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am1)	-3,076	-0,949	-3,698	-6,314	-4,799
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am2)	-0,403	1,724	-1,025	-3,642	-2,126
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (beta)	-1,286	0,841	-1,908	-4,524	-3,009
Ca ₄ H(PO ₄) ₃ :3H ₂ O(s)	-0,817	0,839	-3,249	-6,852	-4,479
CaCO ₃ xH ₂ O(s)	-3,193	-0,123	-0,195	-0,838	-1,04
CaHPO ₄ (s)	-1,379	-1,85	-3,188	-4,175	-3,317
CaHPO ₄ :2H ₂ O(s)	-1,571	-2,042	-3,38	-4,367	-3,509
Calcite	-1,942	1,128	1,055	0,412	0,21
CaMoO ₄ (s)	-2,119	-2,594	-3,828	-4,925	-4,025
Dolomite (disordered)	-3,941	2,409	2,736	2,132	1,581
Dolomite (ordered)	-3,467	2,883	3,21	2,606	2,055
Ettringite	-27,54	-22,772	-27,409	-33,232	-30,785
FCO ₃ -Apatite	9,51	17,657	11,141	4,324	7,34
Fluorite	-5,303	-5,91	-5,961	-5,982	-6,201
Gypsum	-3,048	-3,559	-4,822	-5,954	-5,208
Huntite	-10,697	2,212	3,34	2,813	1,564
Hydroxyapatite	5,423	10,149	5,989	1,742	3,914
Lime	-19,55	-16,48	-16,553	-17,196	-17,398
Portlandite	-10,274	-7,204	-7,276	-7,92	-8,121
Powellite	-1,841	-2,316	-3,549	-4,646	-3,747
Vaterite	-2,459	0,611	0,539	-0,105	-0,306

Les mesures de DO à 730 nm permettent de suivre la croissance de la culture. Les logarithmes népériens des valeurs de DO sont présentés en Figure 2.32. Après le temps de latence bien visible jusqu'à environ 90 h, il y a une phase de croissance rapide pendant 70 h (avec un temps de génération ~23 h) suivie d'une phase de croissance exponentielle plus lente (~89 h) jusqu'à 330 h. La transition entre les deux phases se produit au moment où la concentration en calcium dans le milieu commence à diminuer de façon importante. La fin de la deuxième phase de croissance se produit, ici encore, lorsque le milieu extérieur est complètement appauvri en calcium.

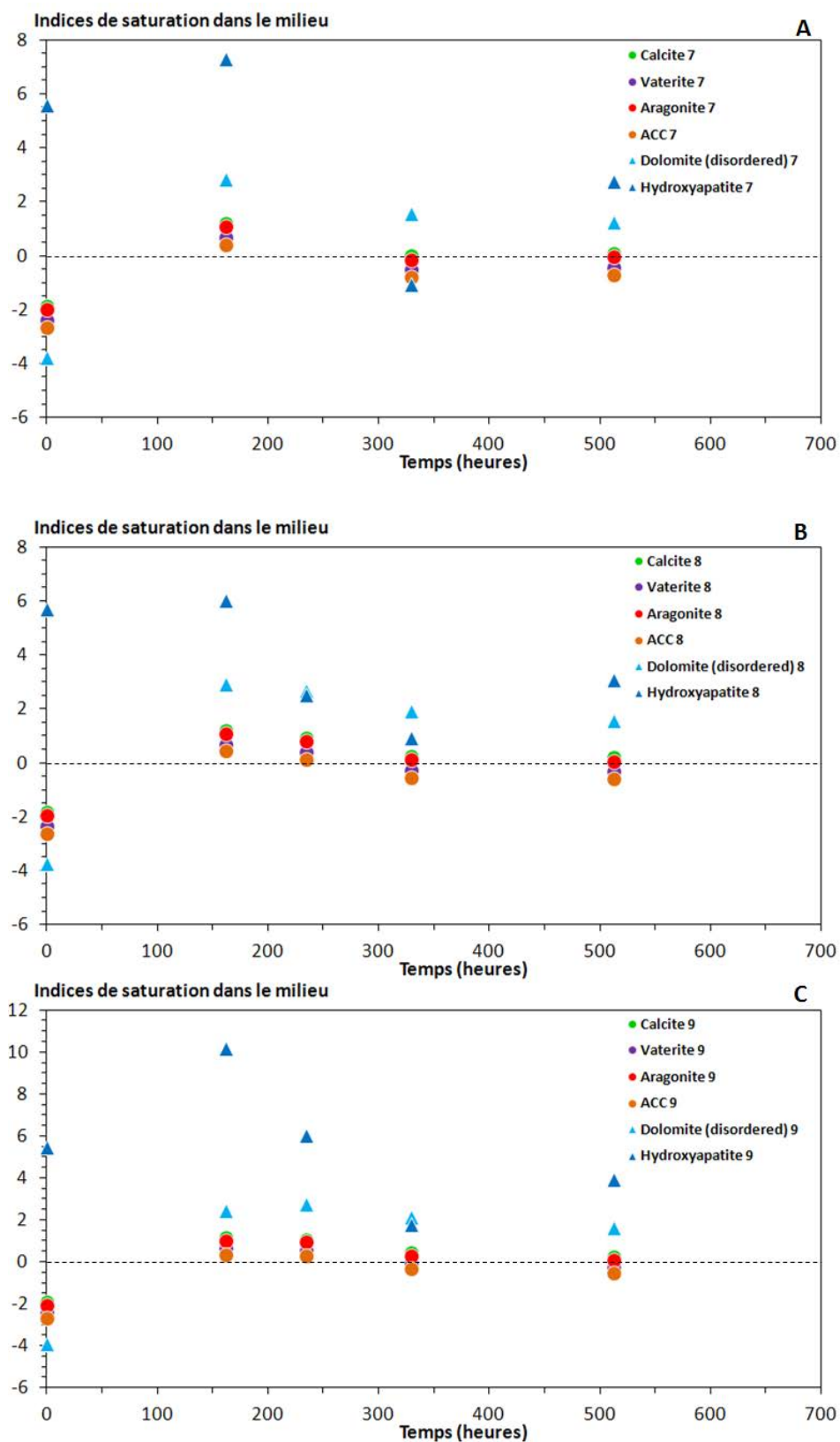


Figure 2.31 : Culture de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 45 °C. Indices de saturation de phase contenant du calcium au cours du temps. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

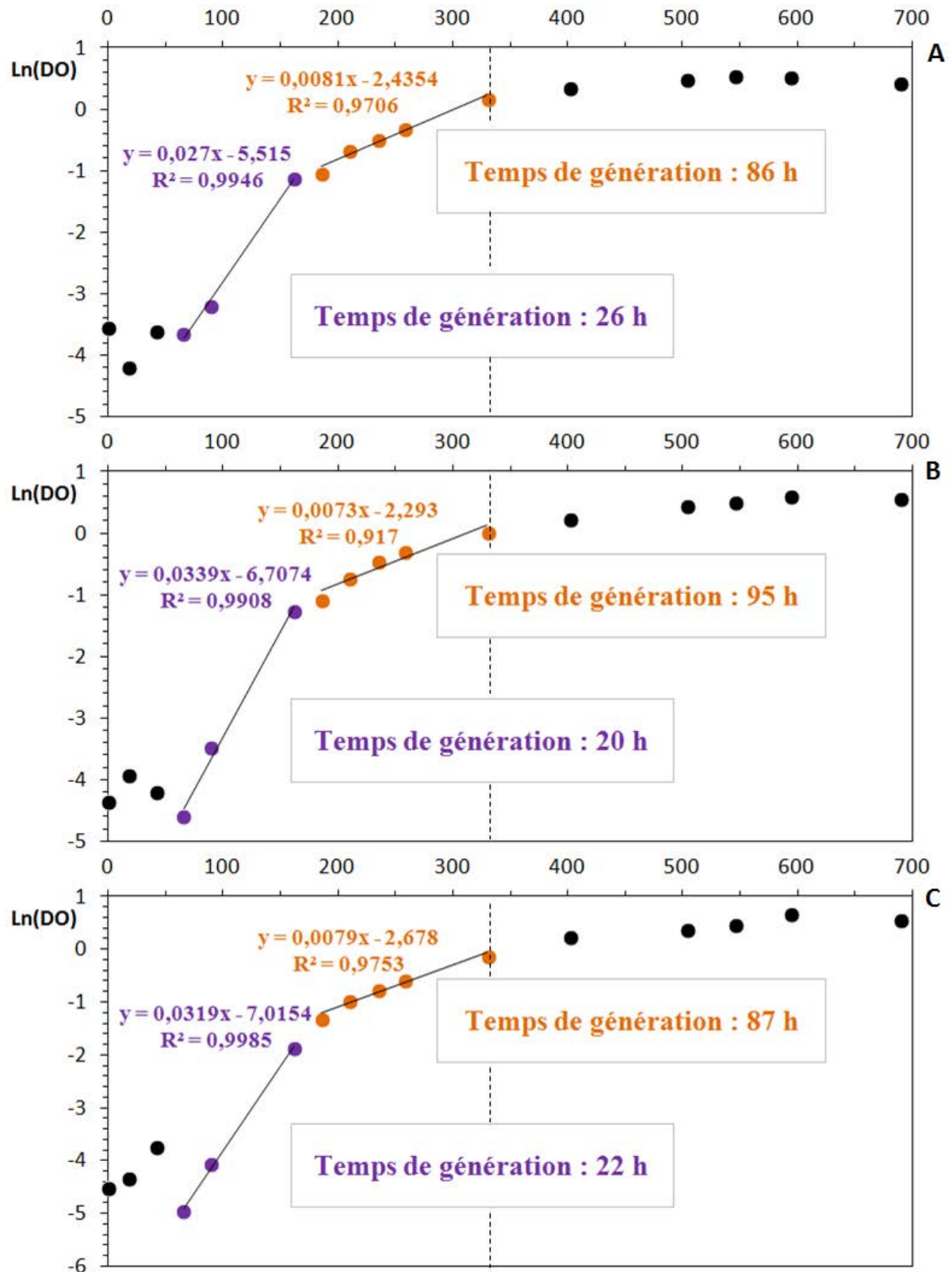


Figure 2.32 : Cultures de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 dans le milieu BG-11. Logarithme népérien de la DO durant la croissance de. Les graphiques A, B et C correspondent aux trois réplicats. Les lignes en tirets représentent le premier point pour le lequel la concentration en calcium est la plus basse.

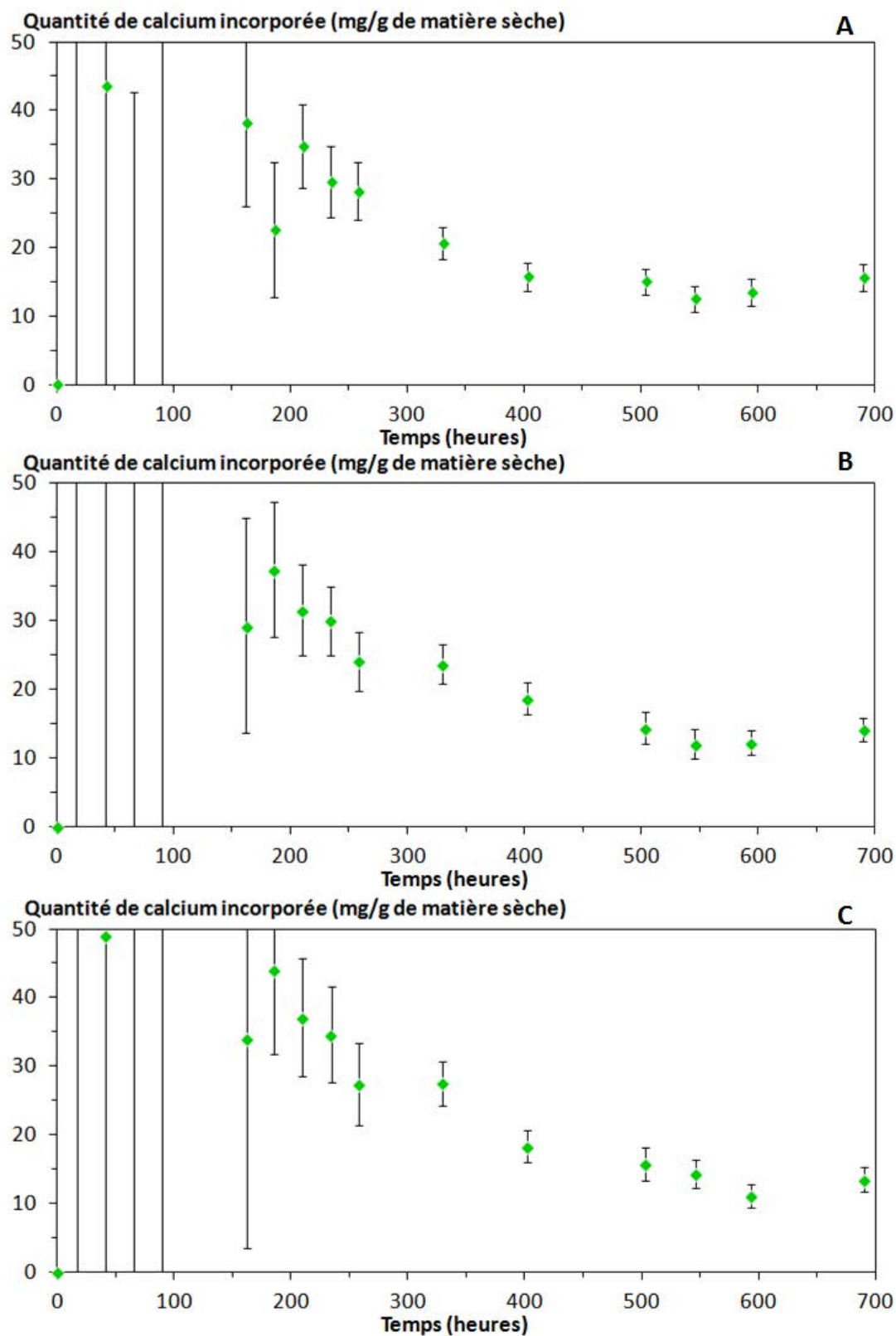


Figure 2.33 : Cultures de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 dans le milieu BG-11. Quantités massiques de calcium incorporé mesurées par colorimétrie. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

La Figure 2.33 présente les quantités incorporées de calcium par la souche BP-1. Le maximum d'incorporation est vers $t = 200$ h. Quand le calcium n'est plus incorporé, la quantité de calcium stagne vers 12-15 mg/g de matière sèche. Les vitesses d'incorporations durant les phases de décroissance de la concentration en calcium sont présentées en Figure 2.34 pour les triplicats. Comme pour les autres souches, la vitesse semble dépendante de la concentration en calcium dans le milieu extracellulaire.

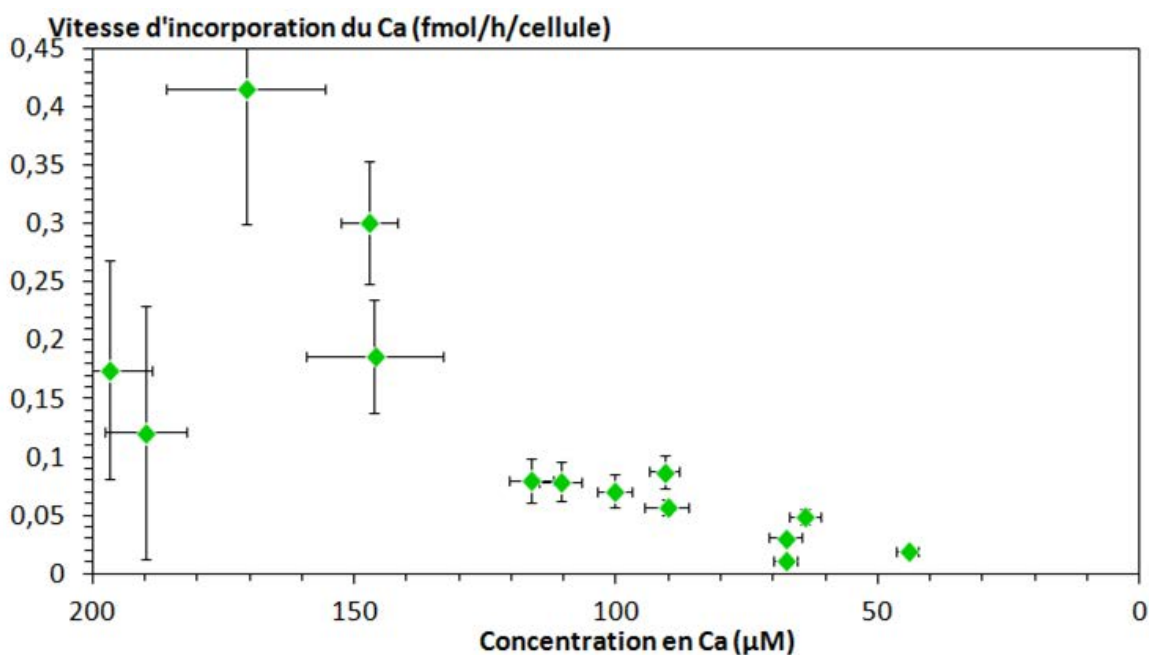


Figure 2.34 : Cultures de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Vitesses d'incorporation du calcium en fonction de sa concentration mesurée par colorimétrie durant la croissance des trois réplicats. Seules les valeurs correspondant aux phases de décroissance sont prises en compte.

2.3.2. Étude microscopique des carbonates intracellulaires

Des analyses en STEM ont été faites à quatre instants de la culture sur un des réplicats. De façon générale, on observe bien que ces cyanobactéries ont des inclusions de carbonates de calcium localisées au niveau des pôles comme décrit dans Benzerara et al. (2014).

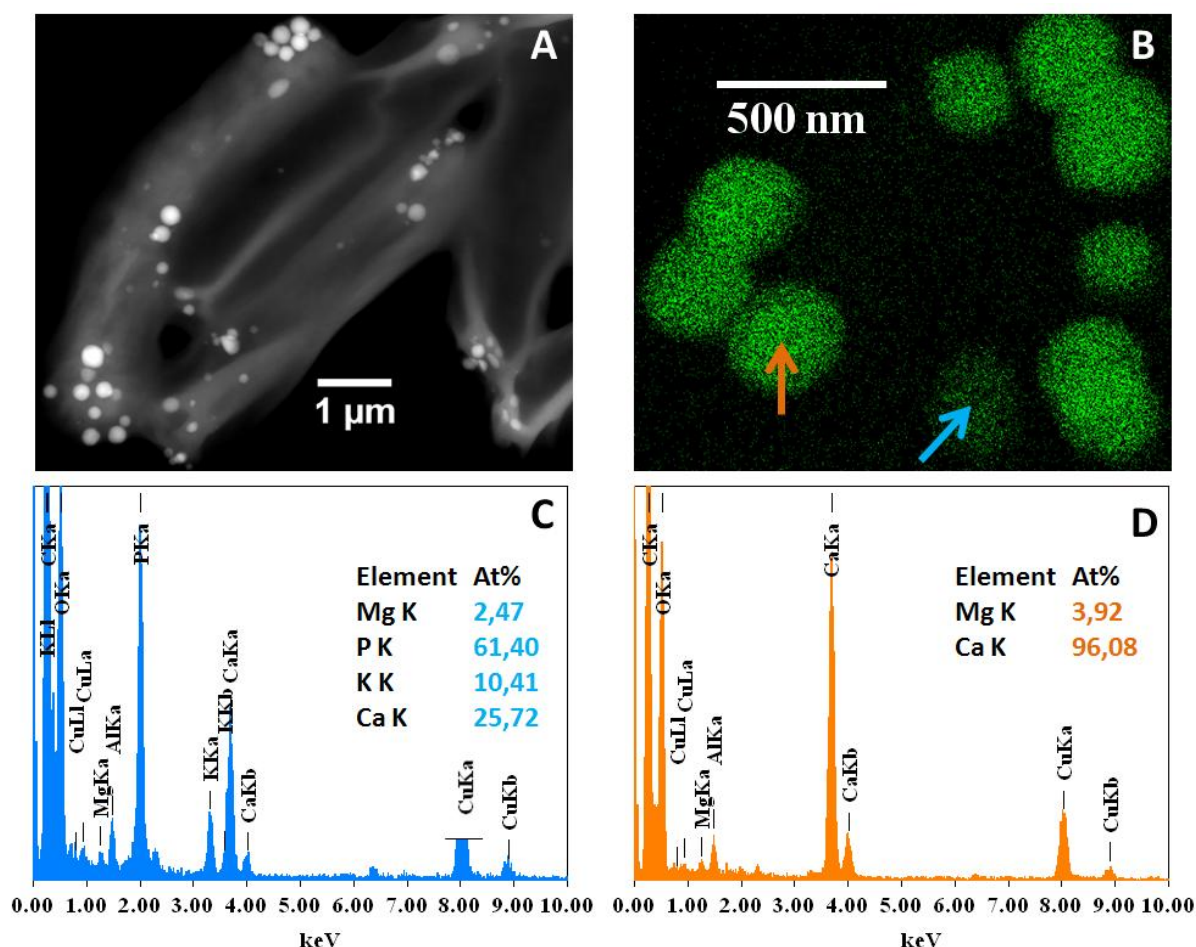


Figure 2.35 : Culture de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 dans un milieu BG-11, sous lumière continue, à 45 °C, à t=234 h. (A) Image STEM HAADF de plusieurs cellules. (B) Cartographie EDXS du calcium d'inclusions intracellulaires. (C) Spectres EDXS d'une inclusion de polyphosphate (flèche bleue). (D) Spectre d'une inclusion de carbonate de calcium (flèche orange).

La Figure 2.35 montre des cellules de *T. elongatus* BP-1 pendant la phase de décroissance (t = 234 h) de la concentration en calcium. Comme pour les autres espèces de cyanobactéries étudiées, certaines cellules ne contiennent pas de carbonates. Sur l'ensemble de la culture et après 234 h d'incubation, chaque cellule contient en moyenne $7,0 \pm 4,8$ particules de carbonate, d'un diamètre moyen de 129 ± 62 nm, ce qui correspond à $0,014 \pm 0,020 \mu\text{m}^3$ de carbonate de calcium.

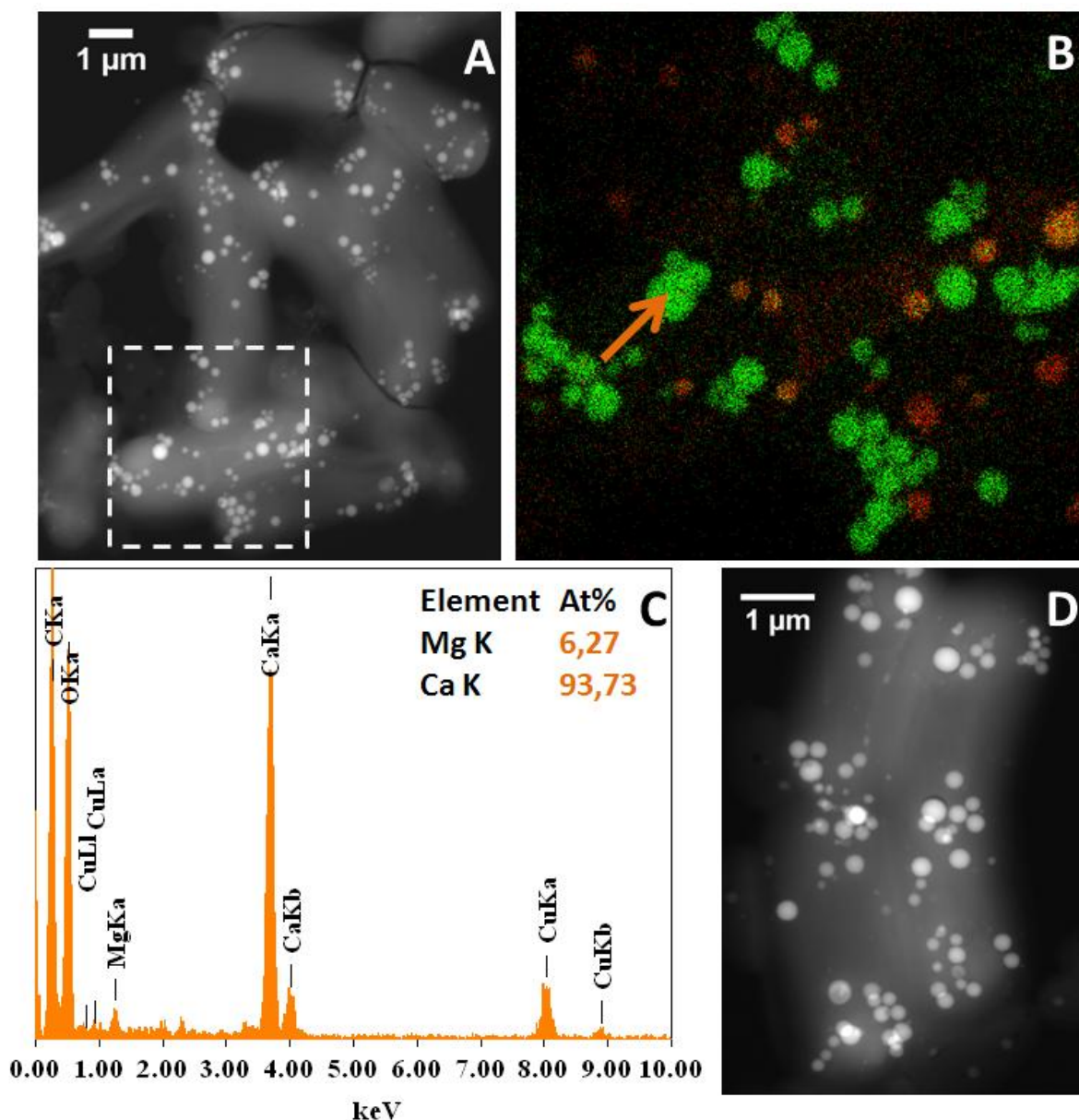


Figure 2.36 : Culture de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 à $t = 525$ h. (A) Image STEM HAADF de plusieurs cellules. (B) Cartographie EDXS du calcium (vert) et du phosphore (rouge) d'inclusions intracellulaires de plusieurs cellules. (C) Spectres EDXS d'un carbonate de calcium. (D) Image STEM de plusieurs cellules contenant des carbonates de calcium.

La Figure 2.36 montre les observations réalisées après 525 h d'incubation. A cet instant, la concentration extracellulaire en calcium est à son minimum ($\sim 12,7 \mu\text{M}$). On voit clairement en STEM que les cyanobactéries contiennent plus de carbonates que pendant la phase de diminution de la concentration en calcium (Figure 2.36). Il y a 18 ± 13 inclusions par cellule, soit plus de trois fois plus qu'à $t = 330$ h. La taille de ces particules est aussi supérieure : ces cellules contiennent donc un plus grand volume de carbonate.

Les observations et calculs faits à partir des données STEM sont résumés dans le Tableau 2.7. À $t = 0$ h, les cellules venant de la pré-culture devraient contenir environ 24 mg de calcium par g de matière sèche.

Au cours du temps, le nombre de carbonates par cellules et leur taille augmentent. Les écart-types restent importants ce qui montre une grande hétérogénéité.

Depuis le début de la culture jusqu'à 330 h d'incubation, le pourcentage de calcium dans les carbonates par rapport au calcium total de la cellule augmente de $1,3 \pm 1,5$ à $3,0 \pm 4,1$ %, puis à 525 h, 23 ± 19 % du calcium des cellules se trouve dans les carbonates. Il semble y avoir une phase d'incorporation du calcium par la souche *T. elongatus* BP-1 sous forme dissoute, suivie d'une phase de formation d'inclusions de carbonates à partir du calcium cellulaire.

Tableau 2.7 : Données STEM de la souche *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *données venant de 2 des 3 réplicats.

Thermosynechococcus elongatus BP-1									
temps (h)	MET								
	nombre mesuré		nombre d'inclusion par cellule			diamètre des inclusions			volume d'inclusion par cellule
	cellules	inclusions				(nm)			(μm^3)
0	44	152	3,5	±	2,8	111	±	66	0,0055 ± 0,0062
234	85	596	7,0	±	4,8	129	±	62	0,014 ± 0,020
330	103	565	5,5	±	2,7	131	±	72	0,014 ± 0,017
525	92	1656	18	±	13	172	±	64	0,069 ± 0,053
temps (h)	EDX		quantité de			ICP-AES (3 réplicas)			calcium dans les
	substitution du magnésium		calcium dans les carbonates			calcium total dans les cellules			carbonates
	(%)		(mg/g mat. sèche)			(mg/g mat. sèche)			(%)
0	4,1	± 1,5	0,31	±	0,37	24			1,3 ± 1,5
234	3,7	± 1,2	0,8	±	1,1	35,56*	±	0,86*	2,2 ± 3,1
330	3,7	± 1,8	0,8	±	1,0	25,6	±	2,62	3,0 ± 4,1
525	7,6	± 2,4	3,7	±	3,1	16,36	±	0,65	23 ± 19

2.4. Suivi de culture de cyanobactéries ne formant pas de carbonates intracellulaires : PCC 7942 et PCC 73106

2.4.1. *Synechococcus elongatus* PCC 7942

La souche PCC 7942 est une souche de cyanobactérie ne formant pas d'inclusions de carbonate de calcium intracellulaires. Trois cultures de cette souche ont été incubées dans du BG-11 à 30 °C sous lumière continue. Comme pour les autres cultures, la DO à 730 nm, le pH et la concentration en calcium du milieu ont été suivis au cours du temps. La Figure 2.37 présente ces résultats. Il n'y a pas de phase de latence : la DO augmente jusqu'à la fin du suivi des cultures (900 h). Le pH, lui, augmente jusqu'à 10 en 75 h puis reste à cette valeur jusqu'à la fin du suivi. La concentration en calcium diminue au début : elle est de 100 μM à $t = 200$ h dans l'un des réplicats. Elle revient ensuite à sa valeur initiale, puis chute brutalement d'environ 200 μM à $t = 525$ h à environ 50 μM à $t = 625$ h. Ces tendances sont observées dans les trois réplicats.

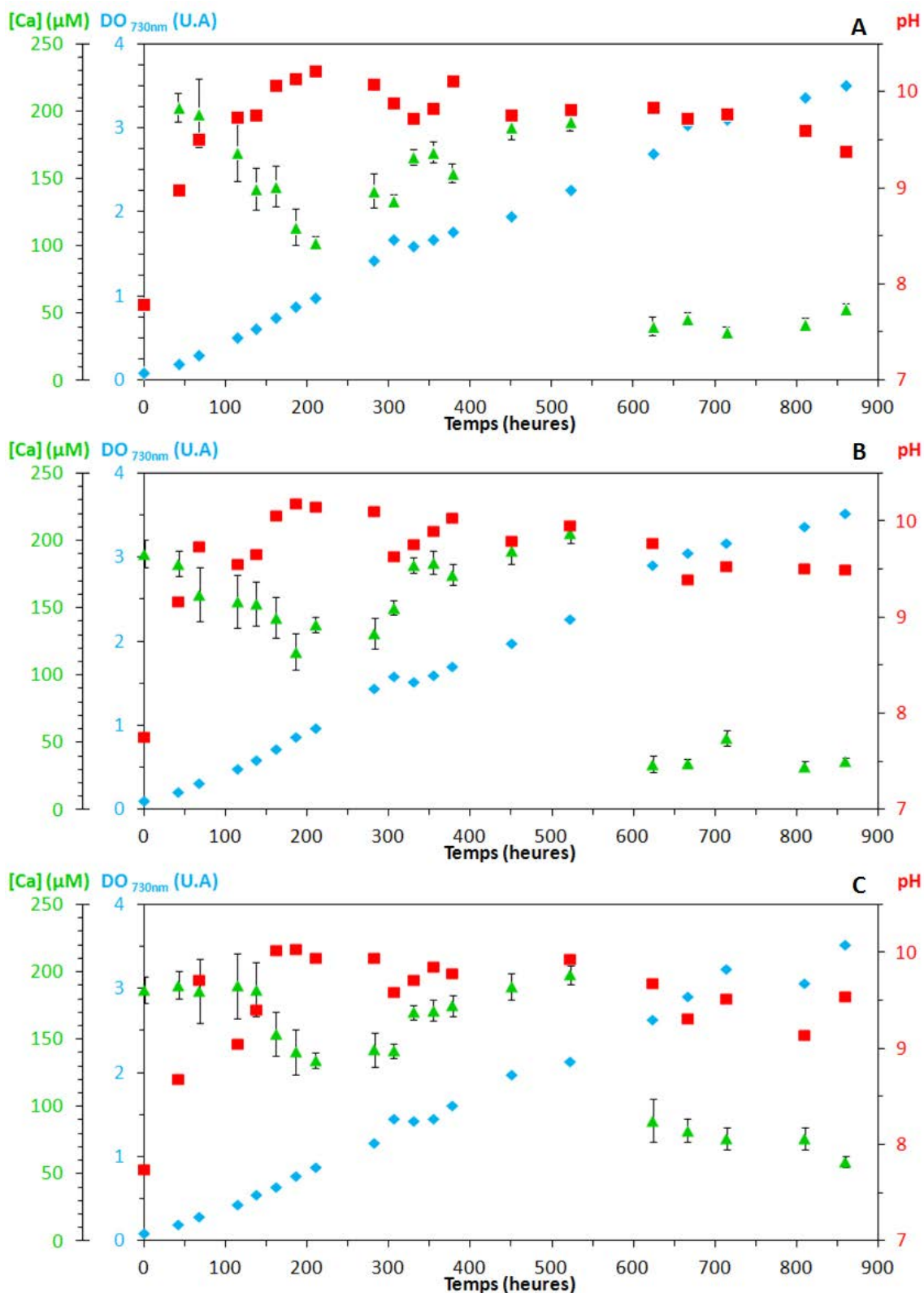


Figure 2.37 : Culture de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 30 °C. Suivi de la DO, du pH et de la concentration en calcium mesurée par colorimétrie dans le milieu. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

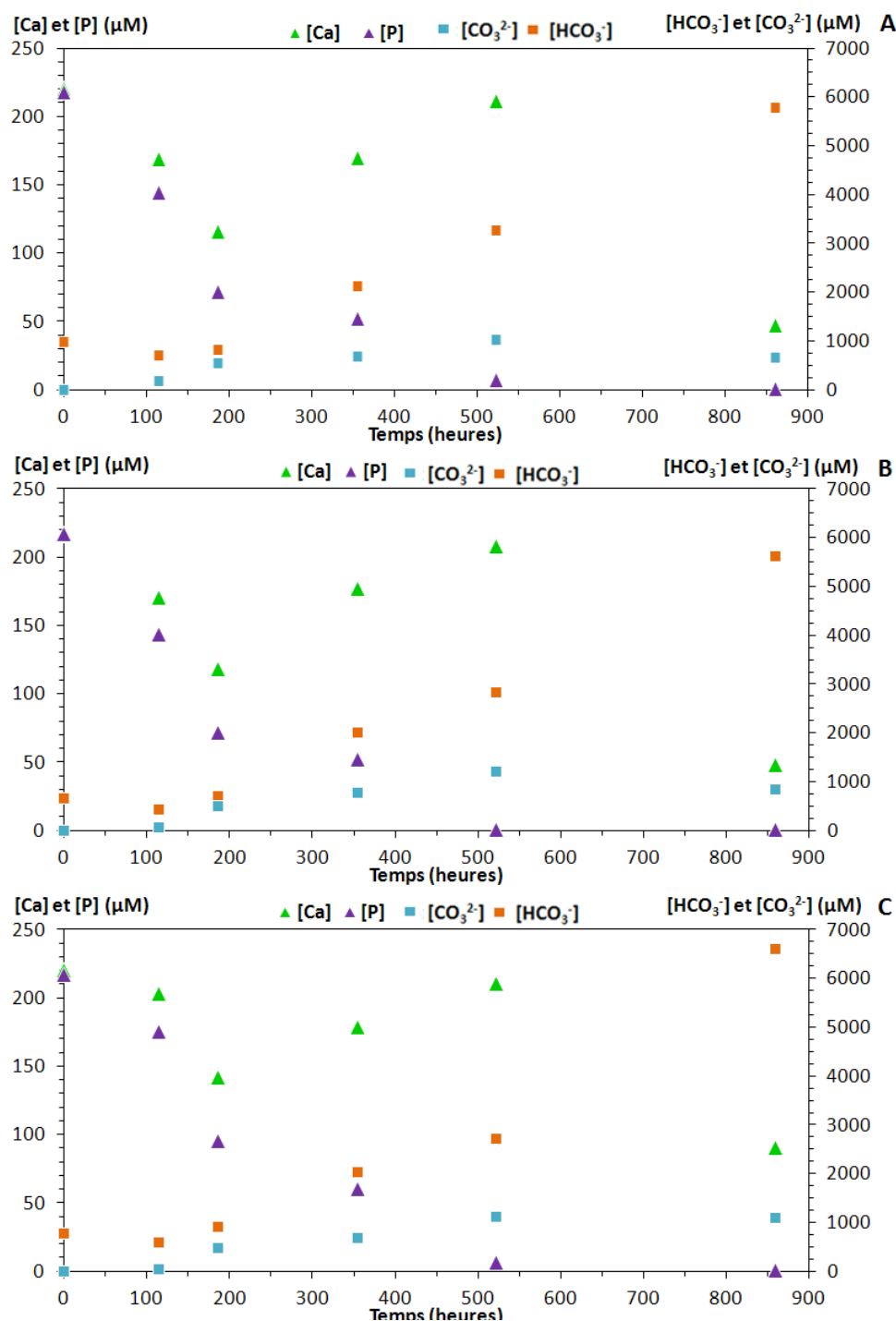


Figure 2.38 : Cultures de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans du BG-11 à 30 °C sous lumière continue. Concentrations du calcium, phosphore, carbonate et hydrogénocarbonate en solution au cours du temps. La concentration en calcium est mesurée par ICP-AES, le phosphore par colorimétrie en flux continu et les ions carbonates et hydrogénocarbonates par calcul, d'après les mesures d'alcalinité. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

À six instants pendant la croissance des trois cultures, des analyses supplémentaires sont faites sur les milieux. La concentration en calcium mesurée par ICP-AES, la

concentration en phosphore et celle du bicarbonate calculée en utilisant la mesure de l'alcalinité totale et celle des espèces acido-basiques présentes, sont présentées en Figure 2.38. Le phosphore diminue jusqu'à quelques μM . Le carbone inorganique, lui, stagne quand le pH augmente puis augmente jusqu'à 6000 μM environ. Les diminutions et augmentations de la concentration en calcium observées en colorimétrie (Figure 2.37) sont confirmées par l'ICP-AES.

Afin de savoir si la diminution brutale du calcium est due à la précipitation d'une phase minérale extracellulaire, les rapports Ca/P de la fraction soustraite à la solution sont reportés en fonction du temps dans la Figure 2.39. On peut voir que ce rapport est constant au début des cultures puis, entre 350 et 550 h, la concentration de phosphore diminue tandis que celle de calcium augmente, le rapport Ca/P est négatif. Lors de la diminution brutale du calcium, la concentration du phosphore ne change pas. Le rapport Ca/P devient donc très grand. En résumé, les variations des concentrations de calcium ne peuvent pas s'expliquer par une précipitation de phosphates de calcium (Tableau 2.2).

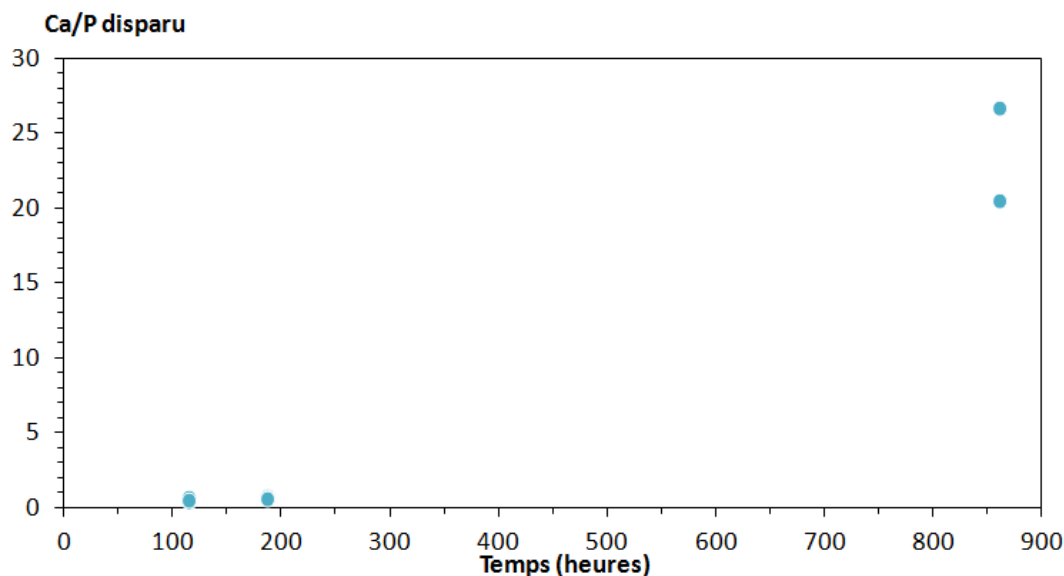


Figure 2.39 : Cultures *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans du BG-11. Rapports Ca/P des diminutions des concentrations en solution de 3 réplicats. La concentration en calcium est mesurée par ICP-AES et celle du phosphore par colorimétrie en flux continue. Un point à 6 293 pour $t = 860$ h n'apparaît pas sur le graphique.

Les valeurs du logarithme de la DO à 730 nm sont présentées en Figure 2.40. On peut voir une première phase de croissance exponentielle de $t = 0$ h à 100 h avec un temps de génération de 38 h en moyenne. Comme pour les souches *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 et *Synechococcus* sp. PCC 6312, cette phase se termine au moment où le pH atteint un plateau. Ensuite les cultures croissent de façon exponentielle jusqu'à environ 300 h avec un temps de génération de 115 h en moyenne.

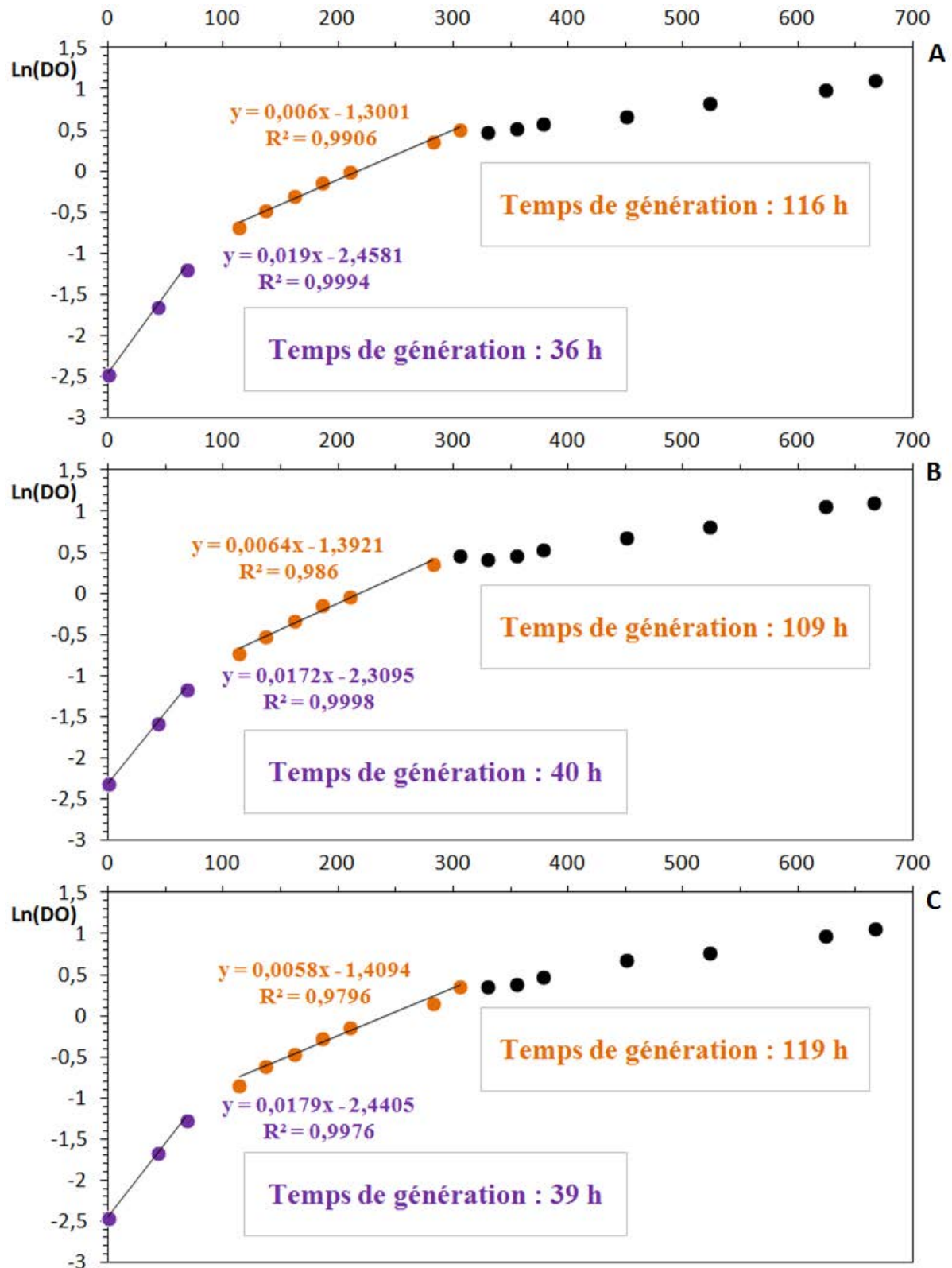


Figure 2.40 : Culture de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans le milieu BG-11. Logarithme népérien de la DO durant la croissance. Les graphiques A, B et C correspondent aux trois réplicats.

Les indices de saturation du milieu pour différentes phases minérales sont présentés dans le Tableau 2.8 pour un des réplicats.

Tableau 2.8 : Indices de saturation des phases contenant du calcium dans une culture de PCC 7942 pendant la croissance.

Temps (h)	0	114	186	355	523	860
ACC	-2,28	0,547	0,496	0,584	0,681	-0,199
Anhydrite	-3,313	-4,54	-5,551	-4,783	-4,751	-4,782
Aragonite	-1,595	1,233	1,18	1,27	1,365	0,492
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am1)	-3,383	-3,192	-5,793	-4,392	-5,809	-8,148
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (am2)	-0,654	-0,462	-3,063	-1,663	-3,079	-5,418
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (beta)	-0,391	-0,2	-2,801	-1,4	-2,817	-5,155
Ca ₄ H(PO ₄) ₃ :3H ₂ O(s)	-1,277	-2,404	-6,279	-4,223	-6,396	-9,467
CaCO ₃ xH ₂ O(s)	-2,778	0,05	-0,002	0,087	0,182	-0,691
CaHPO ₄ (s)	-1,19	-2,509	-3,783	-3,127	-3,883	-4,616
CaHPO ₄ :2H ₂ O(s)	-1,447	-2,765	-4,04	-3,384	-4,14	-4,873
Calcite	-1,455	1,373	1,32	1,41	1,505	0,632
CaMoO ₄ (s)	-2,12	-3,306	-4,296	-3,488	-3,369	-3,22
Dolomite (disordered)	-3,09	2,856	2,926	2,87	2,935	1,682
Dolomite (ordered)	-2,56	3,386	3,456	3,4	3,465	2,212
Ettringite	-26,401	-25,418	-29,045	-26,026	-25,382	-27,183
FCO ₃ -Apatite	12,547	15,198	8,658	12,343	9,283	3,517
Fluorite	-5,294	-6,43	-6,695	-6,447	-6,242	-5,603
Gypsum	-3,086	-4,314	-5,324	-4,557	-4,525	-4,555
Huntite	-9,085	3,099	3,413	3,068	3,072	1,058
Hydroxyapatite	6,399	8,099	4,172	6,317	4,24	0,296
Lime	-20,542	-17,715	-17,767	-17,678	-17,582	-18,456
Portlandite	-10,736	-7,908	-7,961	-7,871	-7,776	-8,649
Powellite	-2,069	-3,255	-4,245	-3,437	-3,318	-3,169
Vaterite	-2,008	0,82	0,767	0,856	0,952	0,079

Le milieu de culture de la souche PCC 7942 devient sursaturé après 114 h pour les phases de carbonate de calcium (ACC, vaterite, aragonite et calcite). Cette sursaturation augmente jusqu'à 523 h puis diminue à 860 h car la concentration en calcium a diminué. Le milieu est aussi fortement sursaturé pour la dolomite (MgCa(CO₃)₂). La Figure 2.41 présente les concentrations en magnésium en parallèle des concentrations en calcium et en phosphore. La concentration en magnésium diminue progressivement tout au long de la croissance de la culture. Elle n'évolue pas de la même façon que celle de calcium (notamment, pas de diminution marquée entre 500 et 850 h).

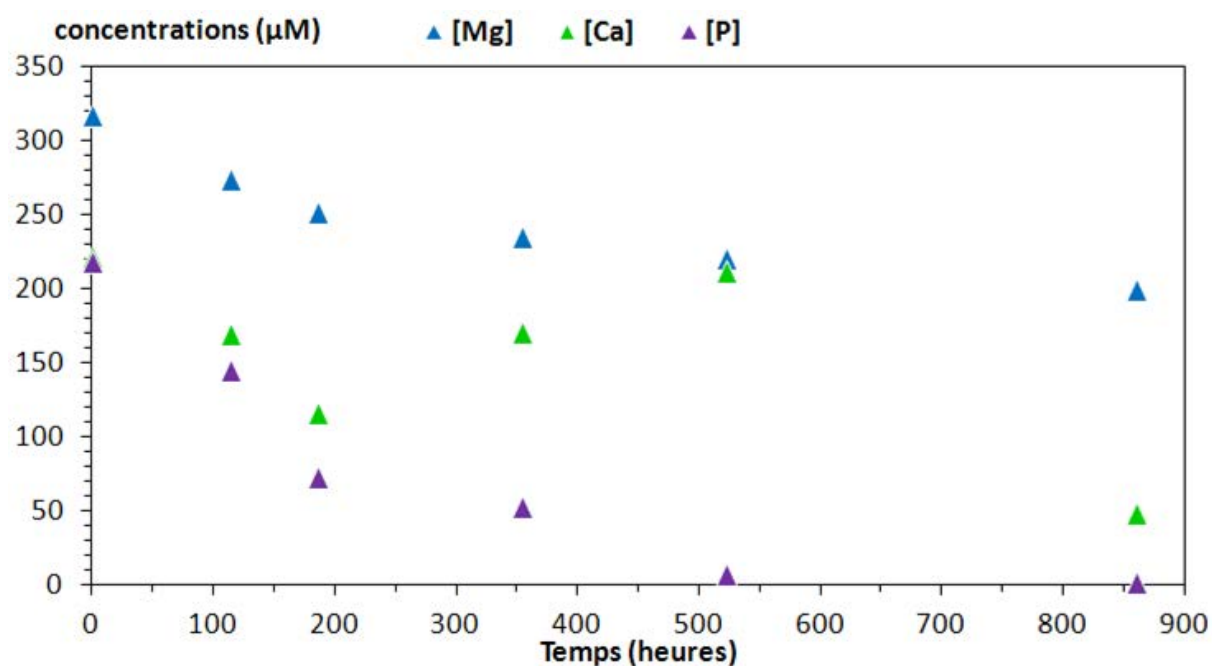


Figure 2.41 : Culture de *S. elongatus* PCC 7942 dans du BG-11. Concentrations du milieu en magnésium et calcium mesurées par ICP-AES et concentration en phosphore mesurée par colorimétrie en flux continu.

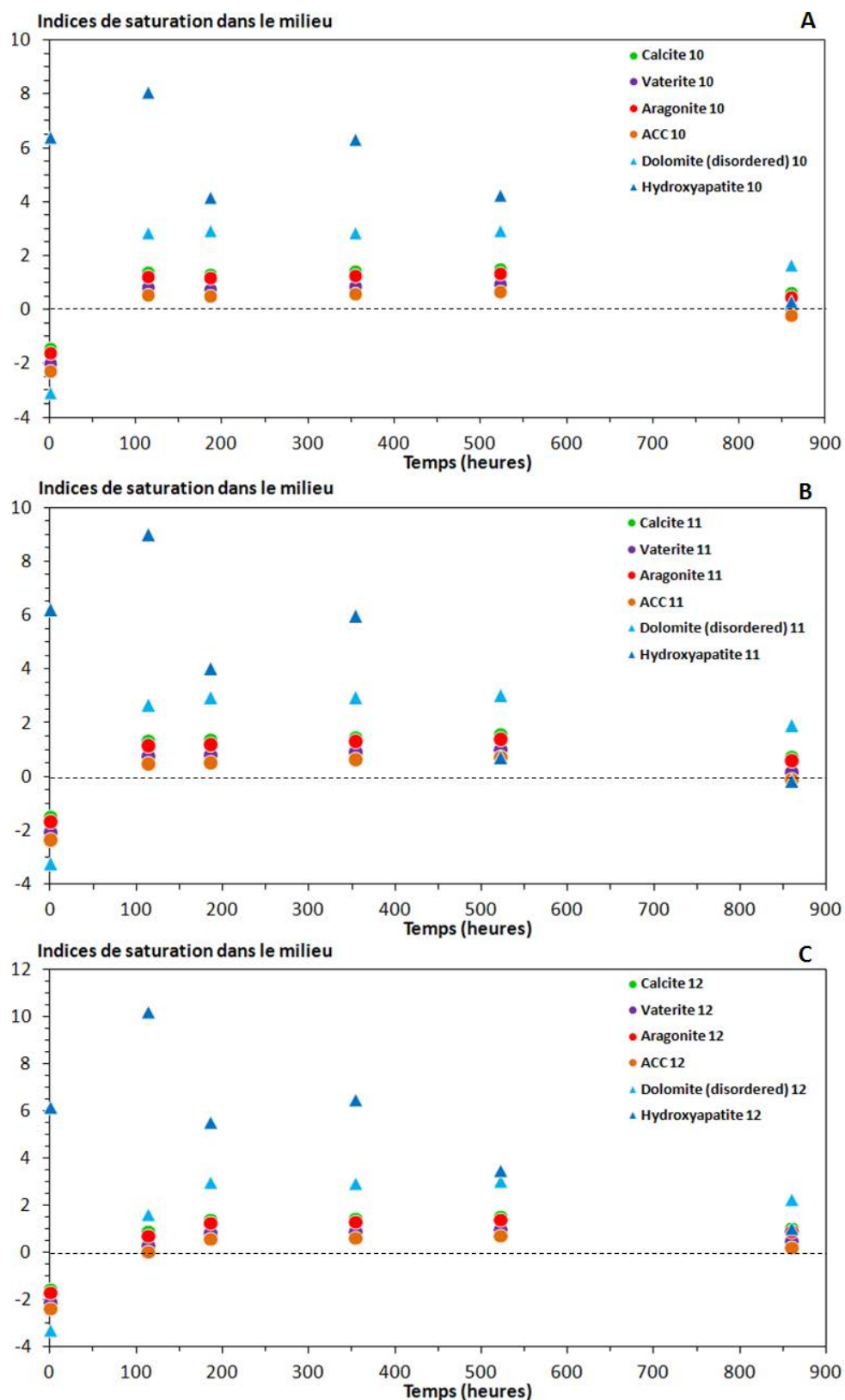


Figure 2.42 : Culture de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 30 °C. Indices de saturation de phase contenant du calcium au cours du temps. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

La Figure 2.42 présente les indices de saturation de quelques phases au cours du temps pour les trois répliquats. Ces indices sont pour la plupart négatifs dans le milieu à $t = 0$. Ensuite, ils deviennent positifs et diminuent après que la concentration en calcium a diminué brusquement (jusqu'à être négatifs dans certains cas).

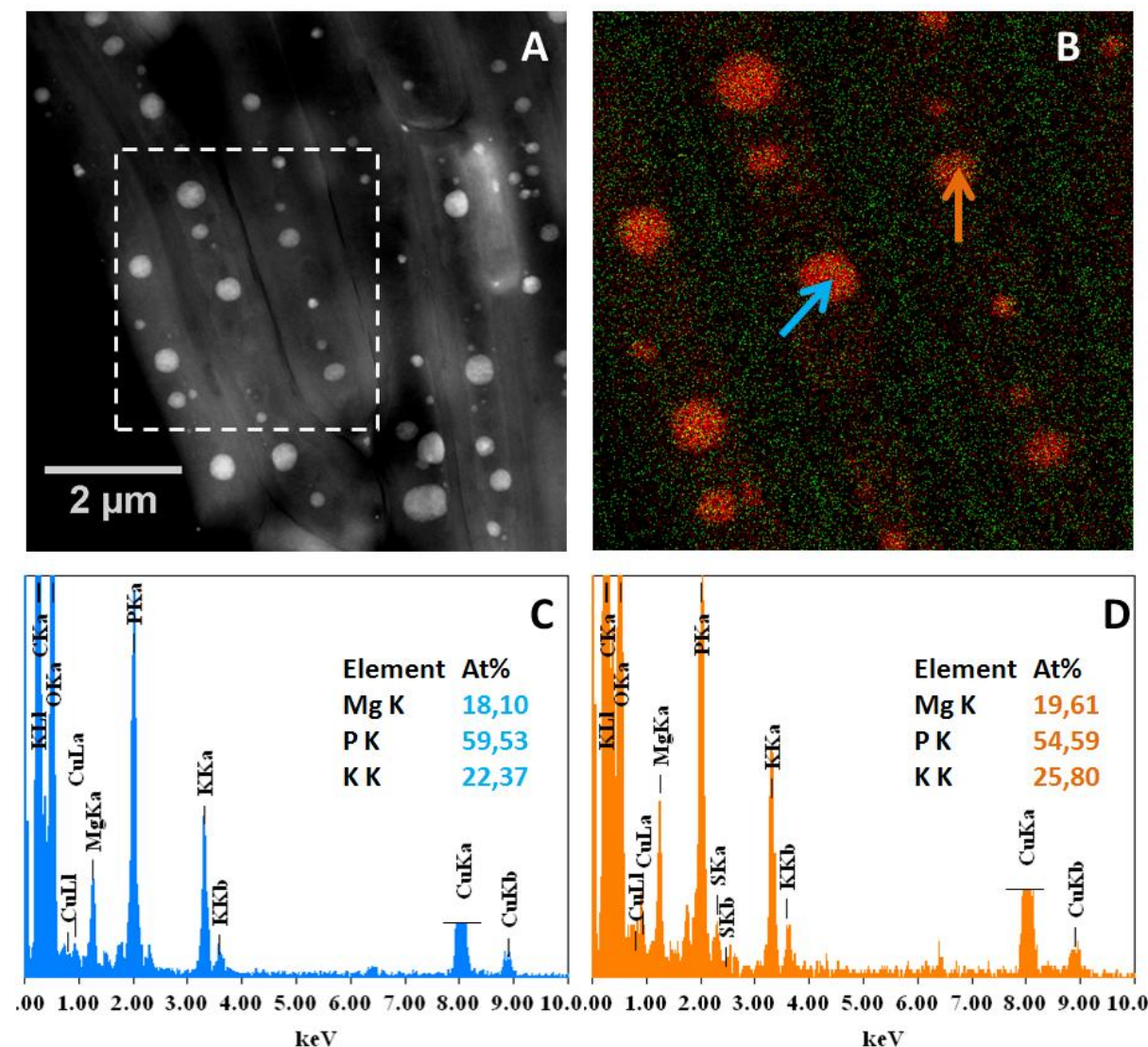


Figure 2.43 : Culture de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 après 860 h d'incubation, à 30 °C, sous lumière continue, dans du BG-11. (A) Image STEM HAAF de plusieurs cellules. (B) Cartographie EDXS du calcium (vert) et du phosphore (rouge). (C) Spectre de la particule indiquée par une flèche bleue. (D) Spectre de la particule indiquée par une flèche orange. Aucun carbonate de calcium n'est observé.

La Figure 2.43 montre des images en microscopie électronique en transmission de la souche PCC 7942 à $t = 860$ h. On peut voir des particules riches en phosphore. Du potassium et du magnésium entrent aussi dans la composition avec des teneurs compatibles avec des polyphosphates. Aucun carbonate de calcium n'est présent malgré la sursaturation du milieu pour les carbonates de calcium. De plus, ces polyphosphates

ne contiennent pas de calcium (Les raies $K\alpha$ du calcium à 3,692 eV et $K\beta$ à 4,013 eV sont absentes). Aucun précipité extracellulaire contenant du calcium n'est visible. La présence de phosphate de calcium extracellulaire ou de carbonate extracellulaire n'est pas confirmée, on ne peut donc pas conclure sur l'origine de la disparition du calcium dans le milieu.

Comme pour les autres souches, nous avons calculé les vitesses d'incorporation par cellule et les quantités incorporées massiques de calcium.

La Figure 2.44 présente les vitesses de diminution de la concentration en calcium. Dans les trois cultures la vitesse ne dépasse jamais 0,04 fmol/h/cellule (même lors de la diminution brutale de la concentration en calcium) ce qui est d'un ordre de grandeur inférieur aux vitesses mesurées pour les souches formant des carbonates intracellulaires.

La Figure 2.45 présente les quantités de calcium accumulées par les cellules. La quantité maximale est de 21 mg de calcium par g de matière sèche. Cette quantité est comparable avec celles mesurées chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 mais bien inférieure à ce qui est observé pour *G. lithophora* C7 (près de 50 mg par g de matière sèche).

Nous pouvons noter que la diminution brutale de la concentration en calcium vers 600 h dans les trois cultures ne représente qu'entre 7 et 12 mg/g de mat. sèche donc moins que ce qui est accumulé au début de la culture.

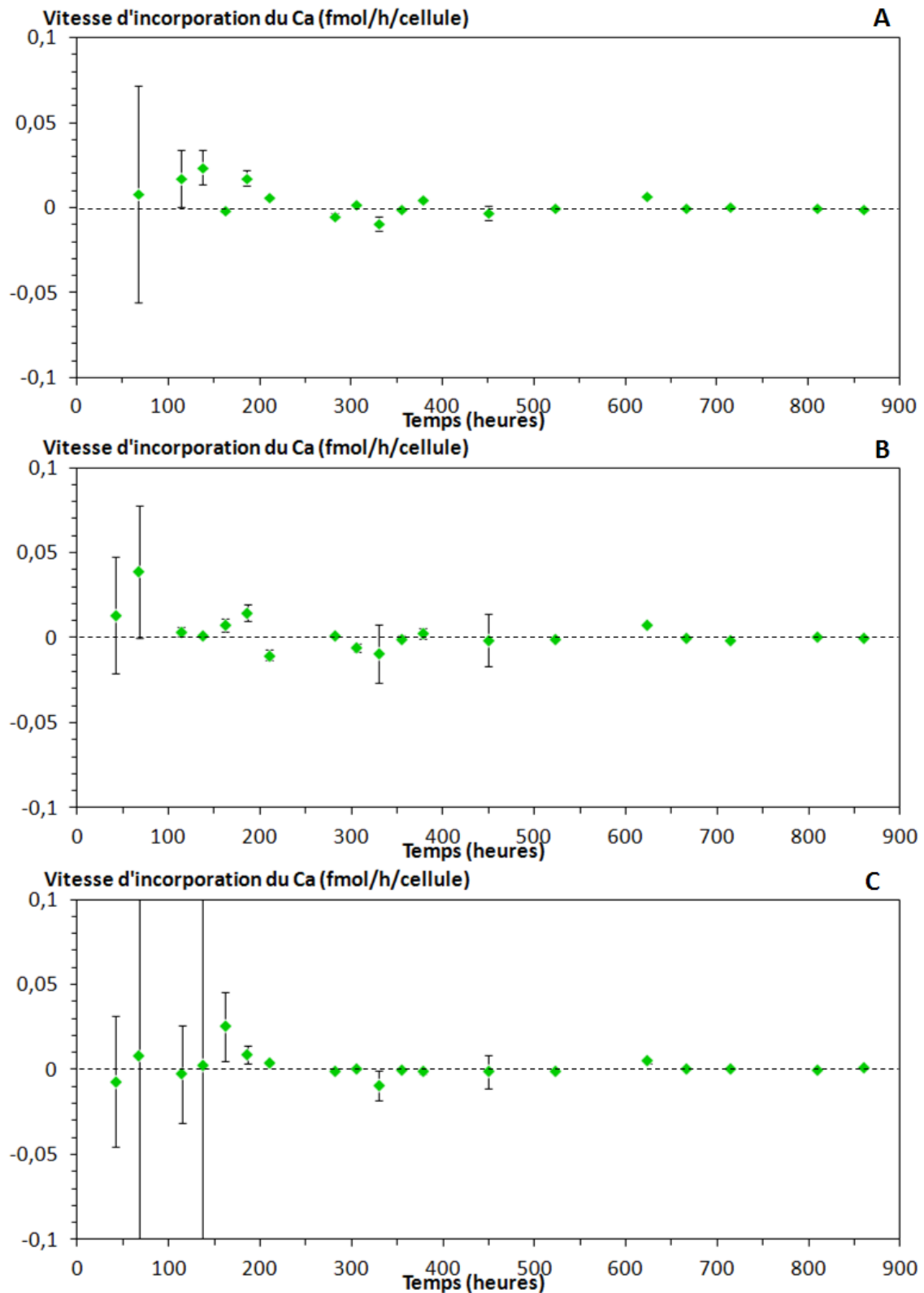


Figure 2.44 : Cultures de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans du BG-11. Vitesses apparentes d'incorporation du calcium mesuré par colorimétrie. Les graphiques A, B et C correspondent à 3 réplicats.

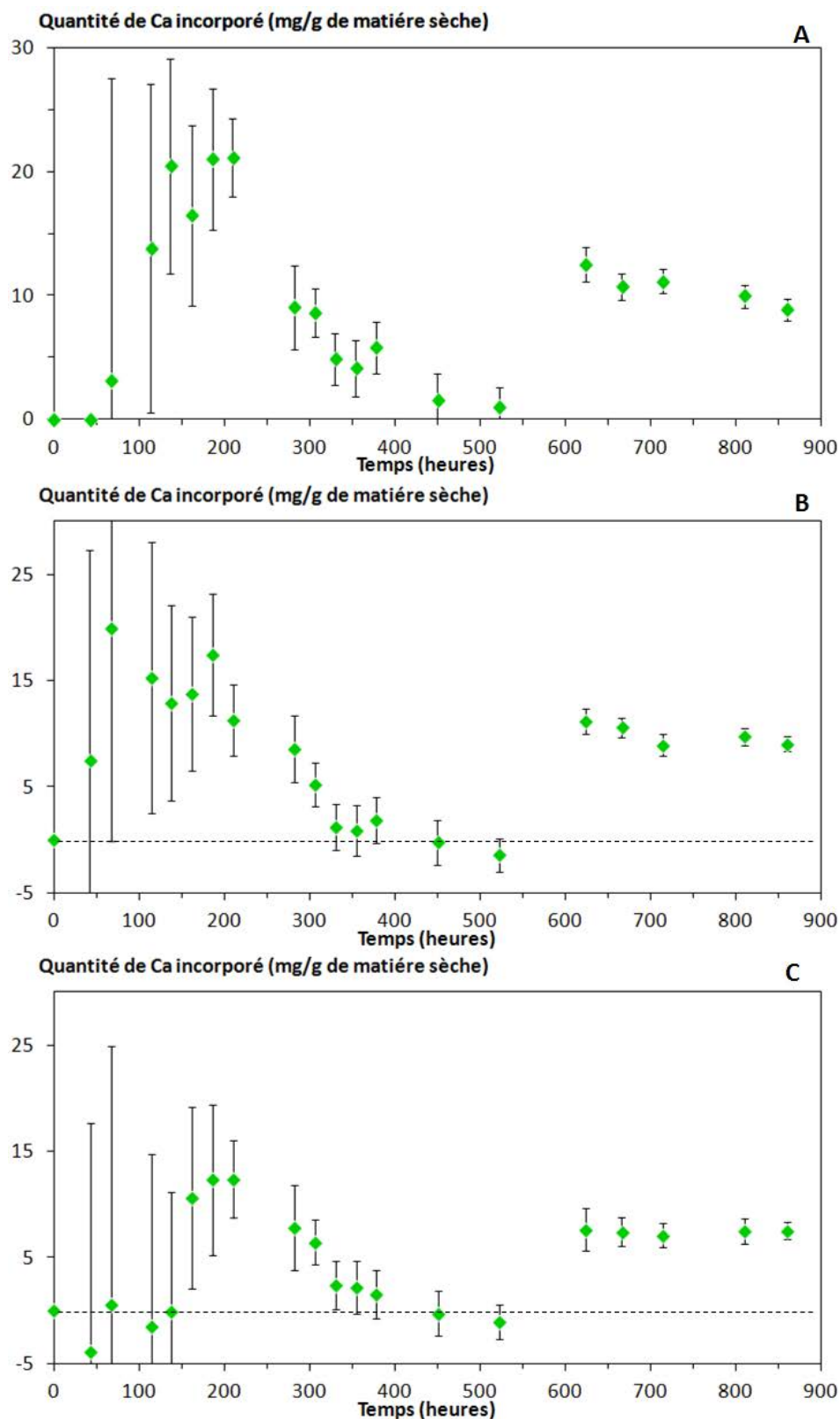


Figure 2.45 : Cultures de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans du BG-11. Quantités incorporées apparentes de calcium mesuré par colorimétrie. Les graphiques A, B et C correspondent à 3 réplicats.

2.4.2. *Gloeocapsa* sp. PCC 73106

La souche *Gloeocapsa* sp. PCC 73106 est une autre cyanobactérie ne formant pas de carbonate de calcium intracellulaire. Trois cultures sont incubées à 30 °C sous lumière continue dans du BG-11. Le suivi du pH, de la DO à 730 nm et de la concentration en calcium sont présentés en Figure 2.46. On peut voir que dans les trois cas, il y a une phase de latence ou, en tout cas, une croissance lente jusqu'à $t = 400$ h. Pendant ces 400 h le pH augmente de 7,6 à environ 8,5. Après 400 h, la DO augmente de façon plus visible jusqu'à atteindre un plateau vers 0,7 à $t = 800$ h. Le pH, lui, augmente en 200 h jusqu'à un plateau entre 9,5 et 10. Durant tout le suivi, la concentration en calcium stagne ou, tout au plus, baisse très légèrement (jusqu'à 180 μM). La Figure 2.47 présente les logarithmes des valeurs de DO des cultures. On peut voir que les trois cultures ont des durées de génération comparables.

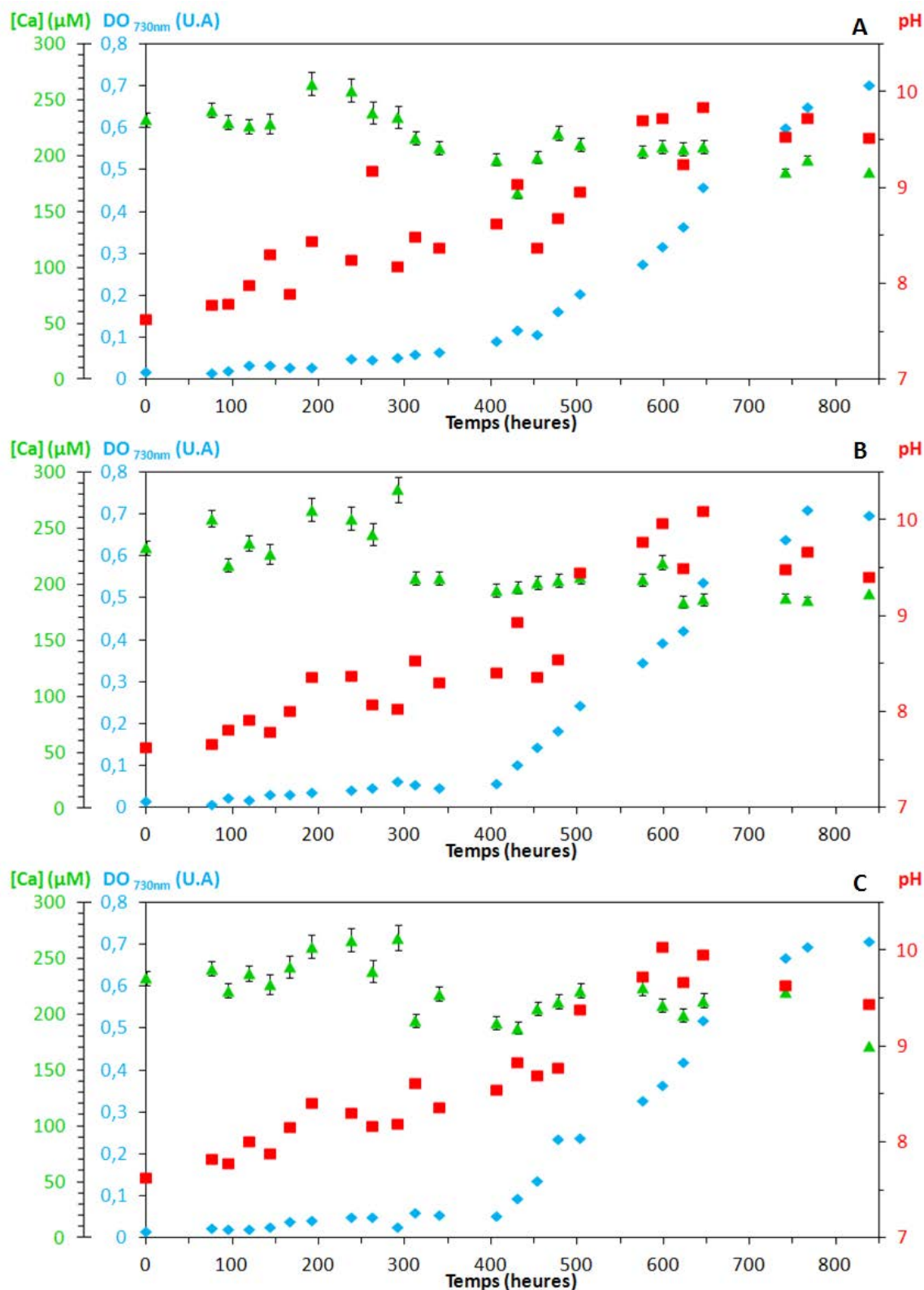


Figure 2.46 : Culture de *Gloeocapsa* sp. PCC 73106 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 30 °C. Suivi de la DO, du pH et de la concentration en calcium mesurée par colorimétrie dans le milieu. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

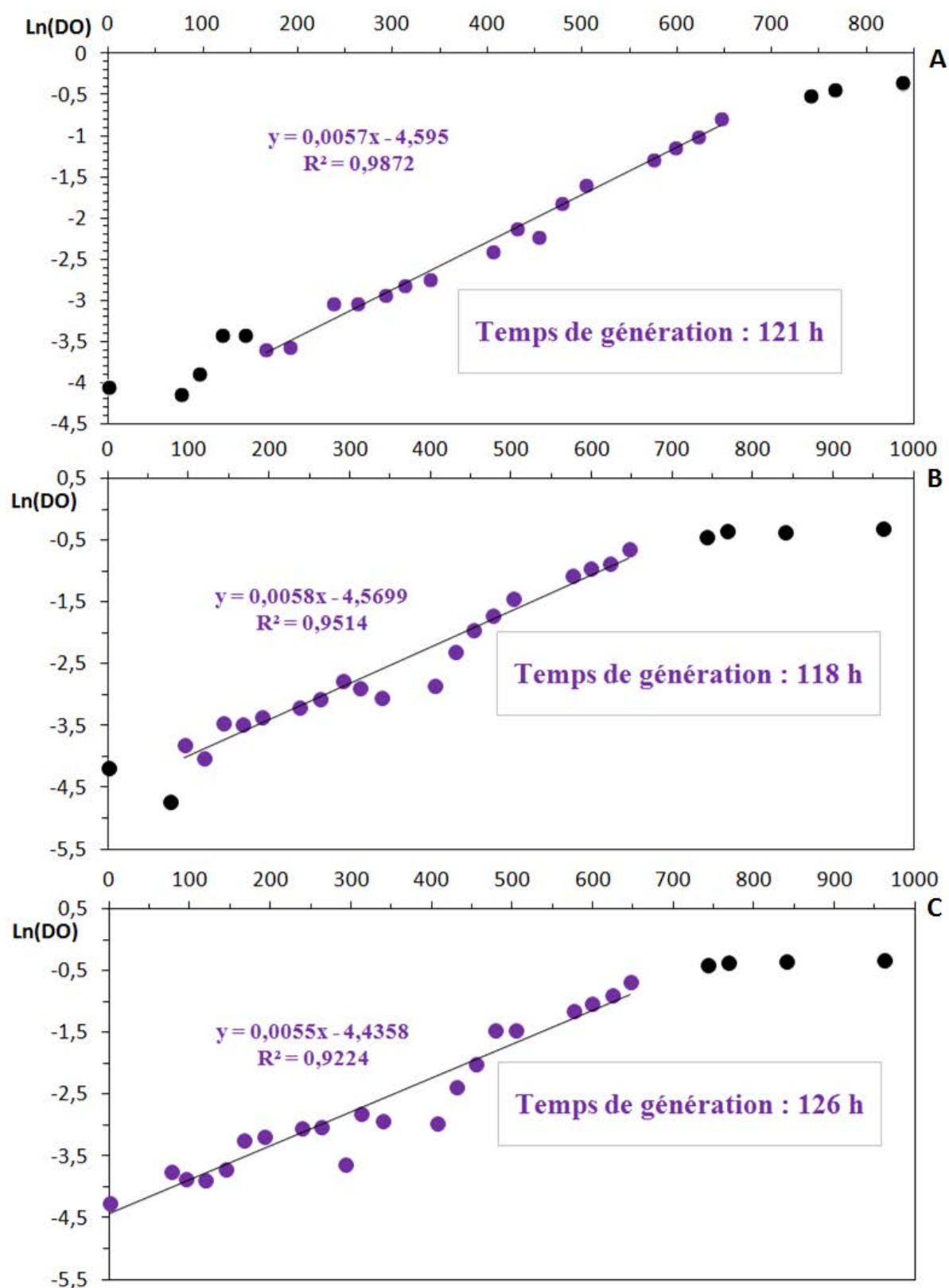


Figure 2.47 : Cultures de *Gloeocapsa* sp. PCC 73106 dans le milieu BG-11. Logarithme népérien de la DO durant la croissance de. Les graphiques A, B et C correspondent aux trois réplicats.

2.5. Effet des modifications de l'environnement sur l'incorporation du calcium

On a vu que les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires sont capables d'incorporer une grande partie des 245 μM de calcium contenus dans le milieu BG-11. Aussi il semble y avoir une corrélation temporelle entre les phases de croissance exponentielle et la phase d'incorporation du calcium. C'est pourquoi nous avons ici cultivé des cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires et à un moment t , nous avons modifié les conditions environnementales pour voir les réponses à ces changements dans le milieu de culture. Parmi ces modifications, nous avons ajouté du calcium dans le milieu, nous avons éteint la lumière ou diminué le pH par ajout de HCl. La souche *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 a été utilisée de préférence car elle croît rapidement.

2.5.1. Effet de l'ajout de calcium sur la croissance cellulaire de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

Cette expérience a été réalisée par Siham De Goeyse, stagiaire de M1 à l'IMPMC. Une culture de BP-1 est incubée à 45 °C dans du BG-11 sous lumière continue. La DO à 730 nm, le pH et la concentration en calcium sont suivis au cours du temps. Après 750 h d'incubation, la concentration en calcium a atteint une valeur de 23 μM et a cessé de diminuer. La culture a alors été séparée en deux et l'équivalent de 250 μM de calcium ont été ajoutés sous forme de CaCl_2 à l'une des deux moitiés. Après 1 000 h d'incubation, 250 μM de calcium ont été ajoutés en plus dans la culture ayant déjà reçu un ajout de calcium. La Figure 2.48 présente le suivi de la culture jusqu'à 1 200 h d'incubation de la culture ayant reçu des ajouts de calcium. La culture témoin sans ajout de calcium est présentée pour comparaison.

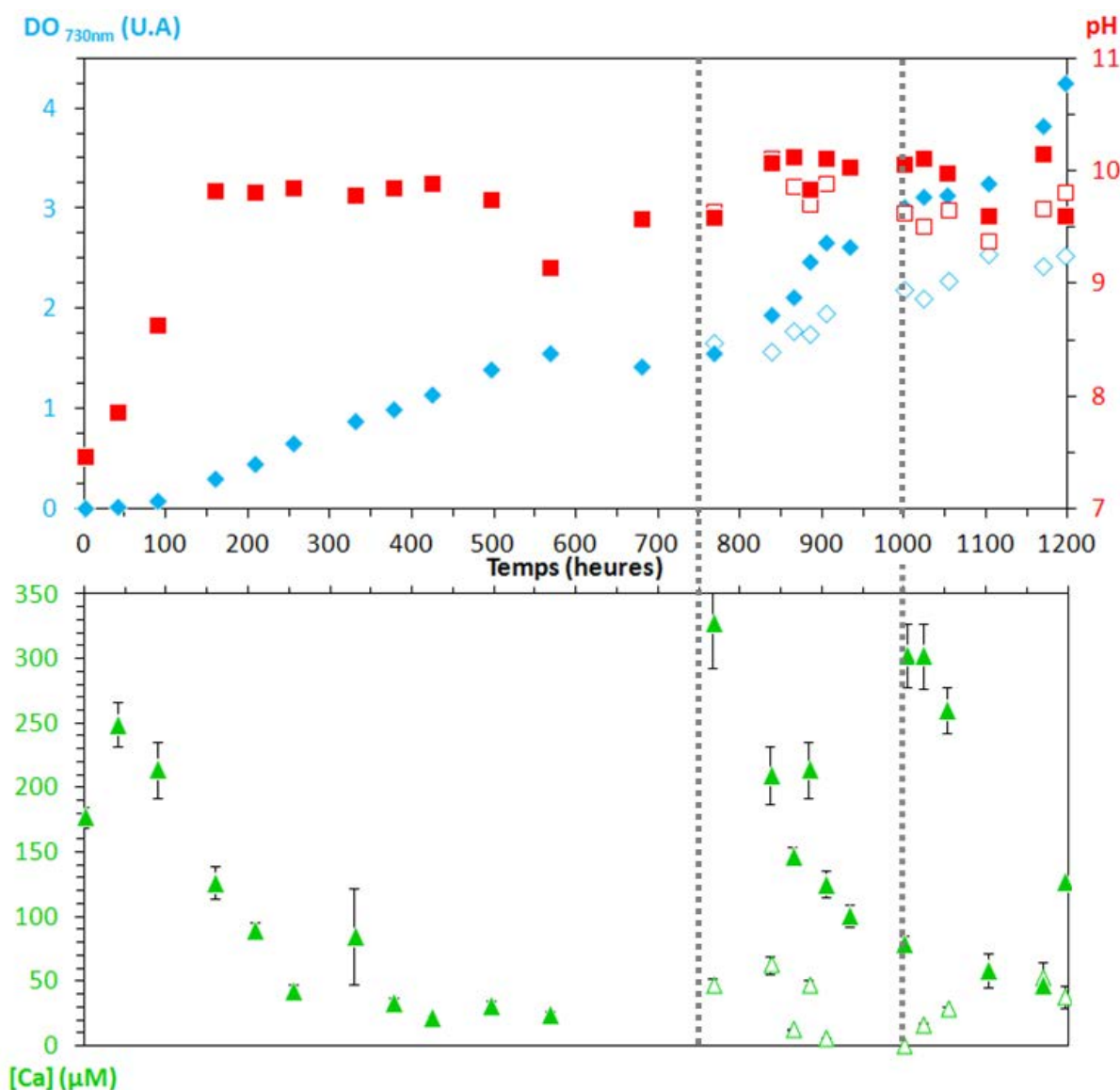


Figure 2.48 : Cultures de *T. elongatus* BP-1. Suivi du pH, de la DO et de la concentration en calcium mesurée par colorimétrie dans le milieu. Les signes pleins correspondent à une culture dans laquelle 250 µM de calcium sont ajoutés à t = 750 h et à t = 1 000 h. Les signes vides correspondent à la culture sans ajout de calcium à partir du moment où la culture de départ est séparée en deux.

Comme pour les autres cultures de la souche BP-1 dans les mêmes conditions, le pH augmente rapidement jusqu'à un plateau situé entre 9,5 et 10. La DO augmente jusqu'à atteindre un plateau vers 1,5. Après le premier ajout de calcium dans le milieu, la DO augmente à nouveau et la culture repart dans une phase de croissance. La culture n'ayant pas reçu d'ajout de calcium supplémentaire augmente aussi légèrement après le plateau. L'ajout de calcium dans le milieu a donc créé un regain de croissance dans la culture de cyanobactéries. Ceci suggère que le calcium est limitant dans ce milieu pour la croissance des cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires.

En parallèle, la concentration en calcium diminue jusqu'à une valeur de 22,5 μM en environ 400 h. Ensuite, lorsque la concentration en calcium est augmentée de 250 μM , on observe une décroissance subséquente de la concentration en calcium plus rapidement que la première diminution. Entre 40 et 255 h, la concentration en calcium diminue de 0,96 $\mu\text{M}/\text{h}$, entre 750 et 935 h de 1,36 $\mu\text{M}/\text{h}$. Après le deuxième ajout de calcium ($t = 1000$ h), on voit la concentration en calcium diminuer encore plus rapidement. Entre 1000 et 1100 h, la concentration en calcium diminue de 2,46 $\mu\text{M}/\text{h}$. La vitesse d'incorporation du calcium sur la totalité de la culture augmente avec le nombre d'ajouts de calcium dans le milieu.

Pendant la croissance de la culture, le nombre de cellules augmente. Figure 2.49-A présente la vitesse d'incorporation du calcium normalisée par le nombre de cellules dans la culture où du calcium a été ajouté.

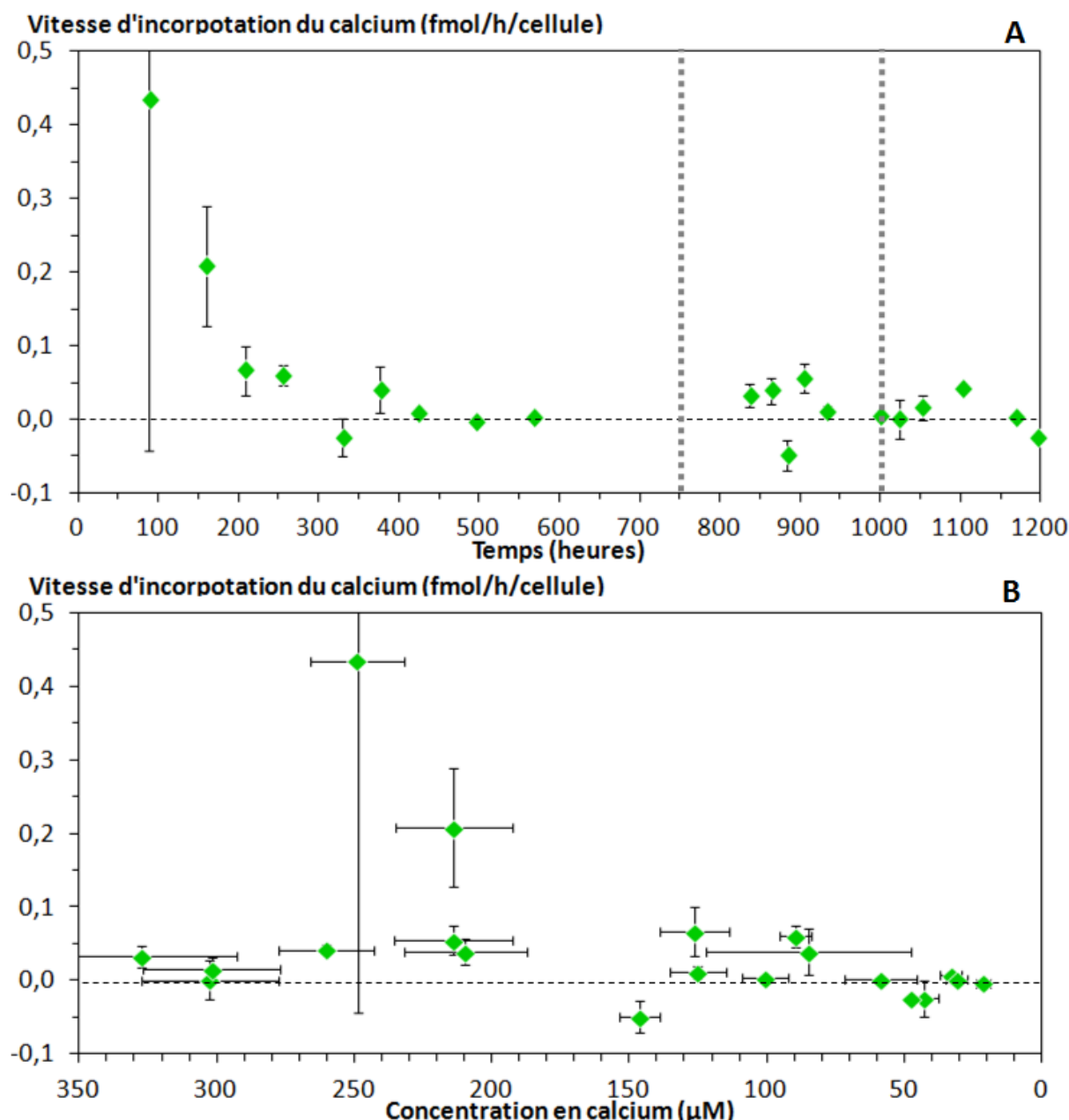


Figure 2.49 : Culture de *T. elongatus* BP-1 dans un milieu BG-11 ayant eu un ajout des $250 \mu\text{M}$ calcium à $t = 750 \text{ h}$ et un à $t = 1000 \text{ h}$. (A) : vitesse d'incorporation du calcium en fonction du temps. (B) : vitesse d'incorporation du calcium en fonction de la concentration en calcium mesurée par colorimétrie.

La vitesse d'incorporation par cellule est maximale au début de la croissance de la culture et diminue avec le temps.

Bien que la vitesse globale d'incorporation du calcium augmente avec le temps dans la culture, la vitesse d'incorporation normalisée par le nombre de cellules n'est pas influencée par l'ajout de calcium. C'est l'augmentation du nombre de cellules qui accélère l'incorporation globale du calcium.

La Figure 2.49-B montre la vitesse d'incorporation du calcium par cellule en fonction de la concentration en calcium dans le milieu. La vitesse d'incorporation par cellule semble indépendante de la concentration en calcium.

Dans les suivis des cultures de *Gloeomargarita lithophora* C7 (§ 2.1), de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (§ 2.2) et de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (§ 2.3), nous avons vu que la vitesse d'incorporation du calcium par cellule semblait liée à la concentration en calcium dans le milieu de culture. Nous avons fait l'hypothèse que l'incorporation du calcium pourrait être contrôlée par un phénomène de diffusion. Cette expérience montre que le lien n'est pas direct entre la concentration en calcium dans le milieu et la vitesse d'incorporation du calcium dans les cellules.

Le logarithme des suivis de la DO est présenté en Figure 2.50. Les phases de croissances exponentielles initiales sont identiques aux autres cultures de cette souche présentées en § 2.3. Après l'ajout de calcium à $t = 750$ h, on voit une croissance plus rapide que la culture sans ajout de calcium. Le temps de génération reste plus long qu'au début de la croissance de la culture mais est plus court que le temps de génération dans la culture sans ajout de calcium.

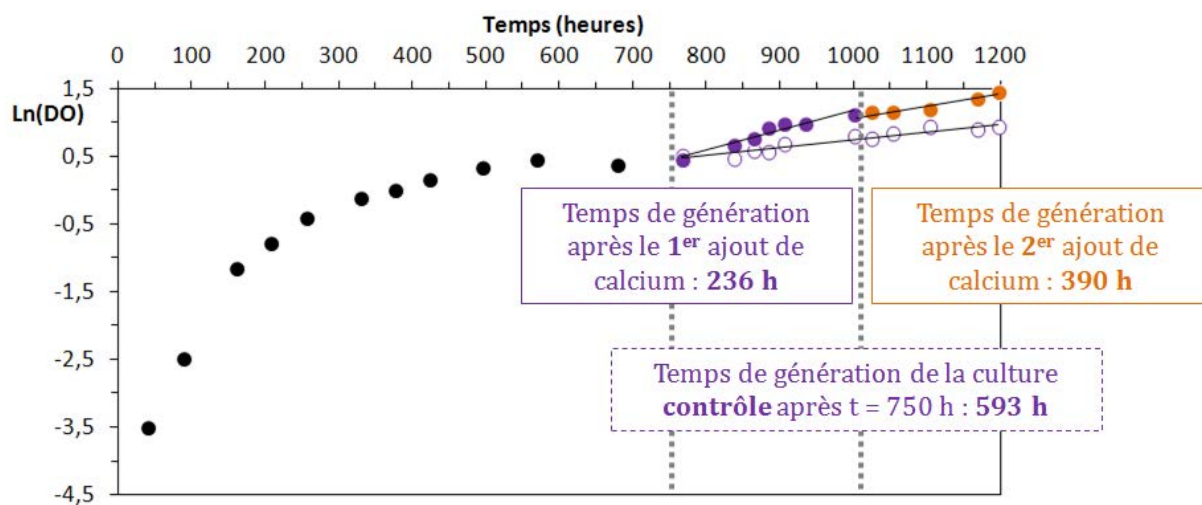


Figure 2.50 : Cultures de *T. elongatus* BP-1 dans du BG-11. Logarithme de la DO à 730 nm au cours du temps. Les signes pleins correspondent à une culture dans laquelle 250 μ M de calcium sont ajoutés à $t = 750$ h et à $t = 1000$ h. Les signes vides correspondent à la culture sans ajout de calcium à partir du moment où la culture de départ est séparée en deux.

2.5.2. Effet de l'ajout de calcium sur la formation de carbonates intracellulaires

Deux espèces sont étudiées ici : *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 et *Gloeomargarita lithophora* C7. Une culture de chacune est incubée dans du BG-11, sous lumière continue à 30 °C pour la souche C7 et à 45°C pour BP-1. Chaque culture est séparée en deux puis 500 µM de calcium (solution mère CaCl₂ à 100 mM) sont ajoutés dans l'une des deux sous-cultures. Il y a donc quatre sous-cultures : BP-1 sans ajout de calcium, BP-1 avec ajout de calcium, C7 sans ajout de calcium et C7 avec ajout de calcium. Des mesures de DO, de pH et de concentration en calcium par colorimétrie sont faites juste avant et 55 h après l'ajout de calcium pour les cultures de BP-1 et 125 h après pour C7. 55 h après l'ajout de calcium pour BP-1 et 125 h pour C7, les cellules de chacune des quatre cultures sont observées en MET et des spectres XANES au seuil K du carbone sont fait sur les culots cellulaires (voir Matériel et Méthodes, § 2.4).

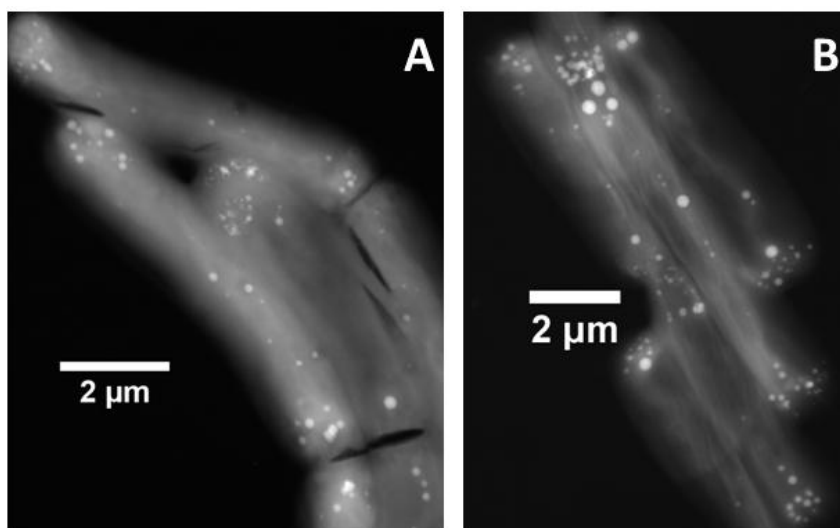


Figure 2.51 : Cultures de *T. elongatus* BP-1 dans du BG-11. (A) Image STEM en mode HAADF de cellules de la culture sans calcium ajouté. (B) Image STEM HAADF de cellules 55 h après avoir ajouté 500 µM de calcium dans le milieu.

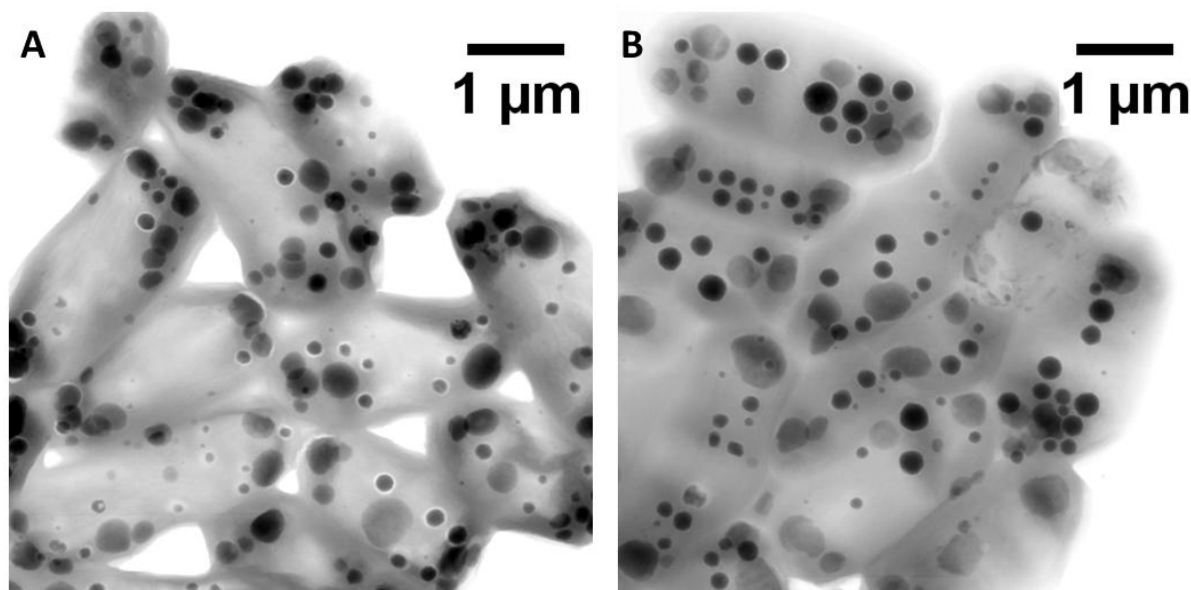


Figure 2.52 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans du BG-11. (A) Image STEM en mode bright field de cellules de la culture sans calcium ajouté. (B) Image STEM bright field de cellules 125 h après avoir ajouté 500 µM de calcium dans le milieu.

Les Figure 2.51 et Figure 2.52 présentent des images STEM des cultures de BP-1 et de C7 avec et sans calcium ajouté. Des comptages sur plusieurs images permettent d'évaluer l'impact de cette modification sur les cellules (Tableau 2.9).

Tableau 2.9 : Comptage et calcul fait sur les images MET des cultures de BP-1 et C7 avec et sans ajout de calcium.*calcul fait à partir de la composition des carbonates de la culture BP-1 ayant eu un ajout de calcium.

<i>Gloeomargarita lithophora</i> C7 et <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1										
	MET									
	nombre mesuré		nombre d'inclusion par cellule			diamètre des inclusions (nm)			volume d'inclusion par cellule (μm^3)	
	cellules	inclusions								
BP-1	45	280	6,2	±	3,0	131	±	54	0,011	± 0,010
BP-1 + Ca	67	649	9,7	±	6,3	137	±	64	0,023	± 0,029
C7	74	258	3,5	±	2,8	149	±	83	0,014	± 0,053
C7 + Ca	53	417	7,9	±	4,8	171	±	84	0,039	± 0,092
	EDXS		quantité de			colorimétrie			calcium dans les carbonates	
	substitution du magnésium (%)		calcium dans les carbonates (mg/g mat. sèche)			calcium total dans les cellules (mg/g mat. sèche)				
BP-1	-	±	-	0,65*	±	0,64*	23,5		3,5	± 3,1
BP-1 + Ca	3,0	±	1,3	1,3	±	1,7	65,5		2,0	± 2,6
C7	19,9	±	4,3	0,7	±	2,5	24,5		3	± 10
C7 + Ca	15,0	±	5,7	1,9	±	4,6	66,0		3	± 7

Chez les deux souches étudiées, l'ajout du calcium ne semble pas modifier la taille des carbonates intracellulaires. Cependant le nombre de particules par cellule augmente avec l'ajout de calcium. Les compositions des carbonates de calcium ne semblent pas altérées. L'ajout de calcium a donc augmenté la quantité de carbonates intracellulaires formés et parallèlement les quantités incorporées de calcium. Pour les deux souches, le pourcentage de calcium contenu dans ces carbonates n'est pas différent avec et sans ajout de calcium. Ce pourcentage est similaire à ceux déterminés pour d'autres cultures de la souche BP-1. Pour la souche *G. lithophora* C7, la proportion du calcium cellulaire qui se trouve dans les carbonates est plus faible que les valeurs trouvées dans d'autres cultures de C7 (cf. § 2.1). La dispersion des résultats implique une grande incertitude sur ce pourcentage calculé.

Pour aller plus loin, des spectres XANES au seuil K du carbone ont été mesurés par Sylvain Bernard et Julien Alléon sur les deux cultures de *G. lithophora* C7 et les deux cultures de *T. elongatus* BP-1. Cette analyse permet de déterminer les proportions des différentes espèces du carbone, notamment le carbone présent dans les carbonates intracellulaires. Un spectre XANES est pris sur une culture d'une souche témoin *Synechococcus elongatus* PCC 7942 qui ne fait pas de carbonate intracellulaire et un autre spectre sur un carbonate amorphe abiotique (caractérisation dans le Chapitre 1-

article). Ces deux spectres de références sont présentés dans la Figure 2.53. Le saut du seuil est proportionnel à la quantité de carbone total de l'échantillon (indépendamment de l'espèce). Nous avons normalisé les spectres avec la même hauteur de saut entre l'avant seuil (~ 280 eV) et l'après seuil (310-315 eV). Le pic situé à 290,3 eV est caractéristique des carbonates. En effet, l'intensité à 290,3 eV du spectre d'absorption des cyanobactéries ne formant pas de carbonate intracellulaire correspond à 0 % de carbone contenu dans des carbonates tandis que l'intensité à 290,3 du spectre du carbonate abiotique correspond à 100 %. Ce pic est attribuable à une transition électronique entre la couche de cœur du carbone et l'orbitale moléculaire π^* des carbonates.

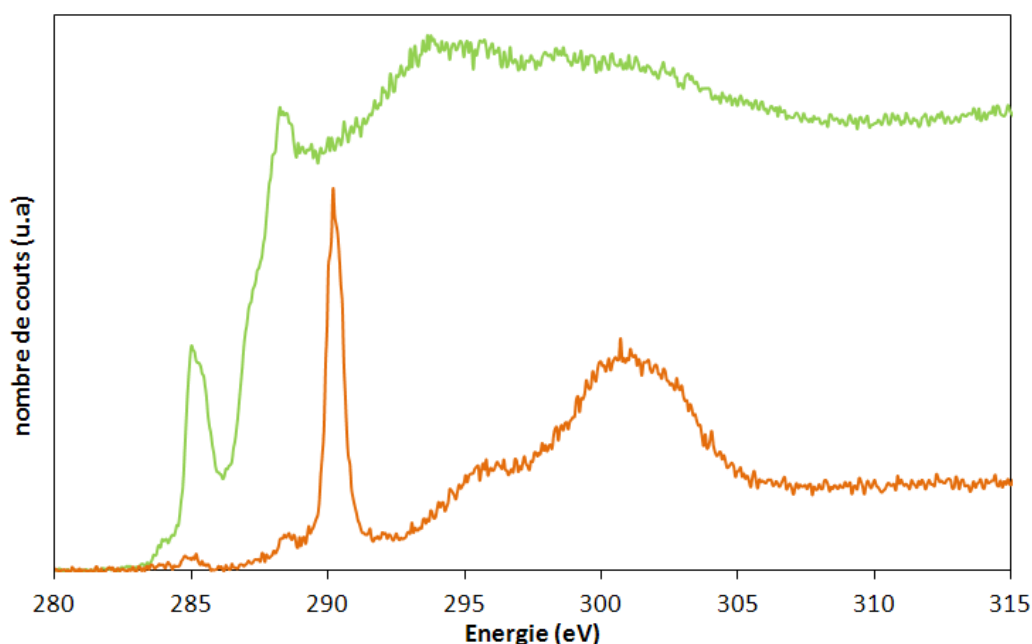


Figure 2.53 : Spectres XANES au seuil K du carbone d'un échantillon de la souche ne formant pas de carbonate, *Synechococcus. elongatus* PCC 7942 (en vert) et spectre d'un carbonate de Mg, Ca, Sr et Ba amorphe (en orange). Le saut est proportionnel à la quantité totale de carbone et le pic d'absorption à 290,3 eV correspond au carbone spécifique des carbonates.

Un spectre d'absorption de cyanobactérie contenant des carbonates est une combinaison linéaire de ces deux spectres de référence : un spectre de cellules sans carbonates et un spectre de carbonate amorphe. Deux spectres XANES normalisés de cyanobactéries peuvent donc être comparés. Plus l'intensité du pic à 290,3 eV sera grande, plus grande sera la proportion de carbonate par rapport au carbone total dans cet échantillon.

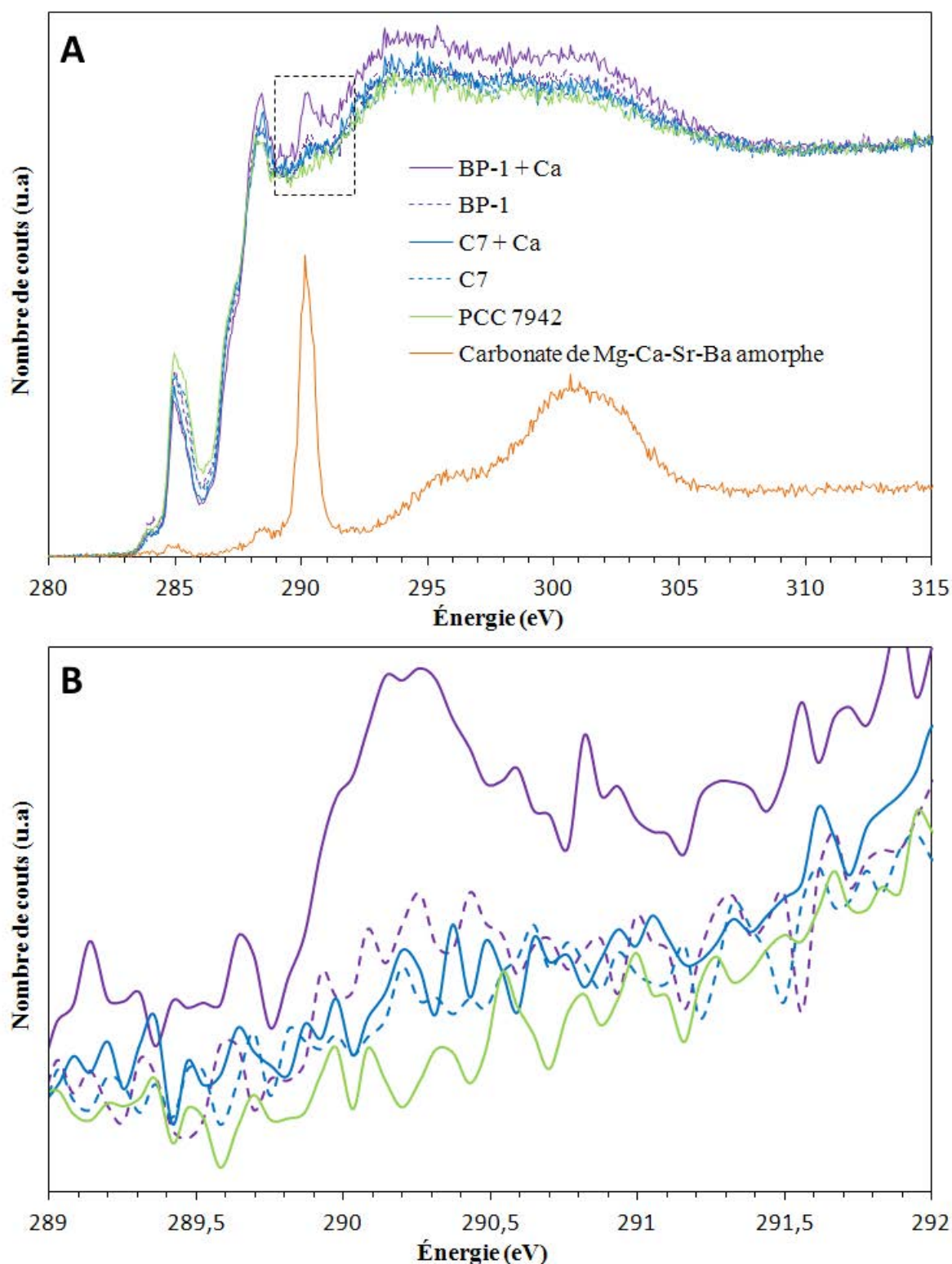


Figure 2.54 : Spectre XANES au seuil K du carbone du carbonate de référence (orange), de la souche de référence *S. elongatus* PCC 7942 (vert), la souche *G. lithophora* C7 (bleu) et la souche *T. elongatus* BP-1 (violet). Les spectres en tirets correspondent aux témoins sans ajout de calcium de C7 et de BP-1 (A). Un zoom est fait sur la zone correspondant au pic du carbone des carbonates (B). Les spectres sont normalisés à la quantité totale de carbone.

La Figure 2.54 présente des spectres XANES au seuil K du carbone. Un zoom est fait sur le pic (290,3 eV). Au niveau du pic correspondant à l'absorption des carbonates (290,3 eV), le spectre de la souche de référence sans carbonate intracellulaire a une absorption inférieure aux autres. Les spectres de la culture de BP-1 n'ayant pas reçu d'ajout de calcium et des deux cultures de C7 présentent un pic à 290,3 eV de faible intensité. Par contre le spectre d'absorption de la culture de BP-1 qui a reçu du calcium en plus présente un pic plus important à 290,3 eV. Cette culture contient donc une proportion de carbonate plus élevée.

Une quantification plus précise montre que dans la culture de *T. elongatus* BP-1 sans ajout de calcium, environ 2,0 % du carbone total des cellules est sous forme de carbonate. La culture de la même souche qui a eu un ajout de calcium en contient 3,2 %. La souche *G. lithophora* C7 n'ayant pas reçu de calcium supplémentaire, contient 1,0 % de carbonate et celle qui a reçu du calcium contient 1,0 % de carbonate par carbone total. Contrairement à ce que semble montrer les observations en MET, les données XANES montrent que la culture de la souche C7 qui a incorporé plus de calcium ne contient pas plus de carbonate. Les deux techniques ont des points faibles différents : la microscopie électronique apporte une information sur un nombre de cellule plus limité que la spectroscopie XANES en bulk. Mais il se peut que la préparation des échantillons pour l'analyse XANES endommage les carbonates. De plus l'ajout de calcium a pu induire une activité des cellules favorisant la formation de carbone organique.

2.5.3. Effet de l'absence de lumière sur l'incorporation de calcium

Une culture de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 est incubée à 45 °C sous 12 h de lumière par jour, dans du BG-11 et la concentration en calcium, le pH et la DO à 730 nm sont suivis. Après 100 h d'incubation, la lumière est allumée en continu. Après la phase d'incorporation du calcium par les cyanobactéries, la culture est placée à l'obscurité en enrobant l'erlenmeyer avec du papier aluminium (à $t = 220$ h). L'évolution des différents paramètres sous illumination et dans l'obscurité est présentée en Figure 2.55 et comparée à celle d'une culture placée dans le même incubateur mais pour laquelle l'illumination n'a pas été interrompue.

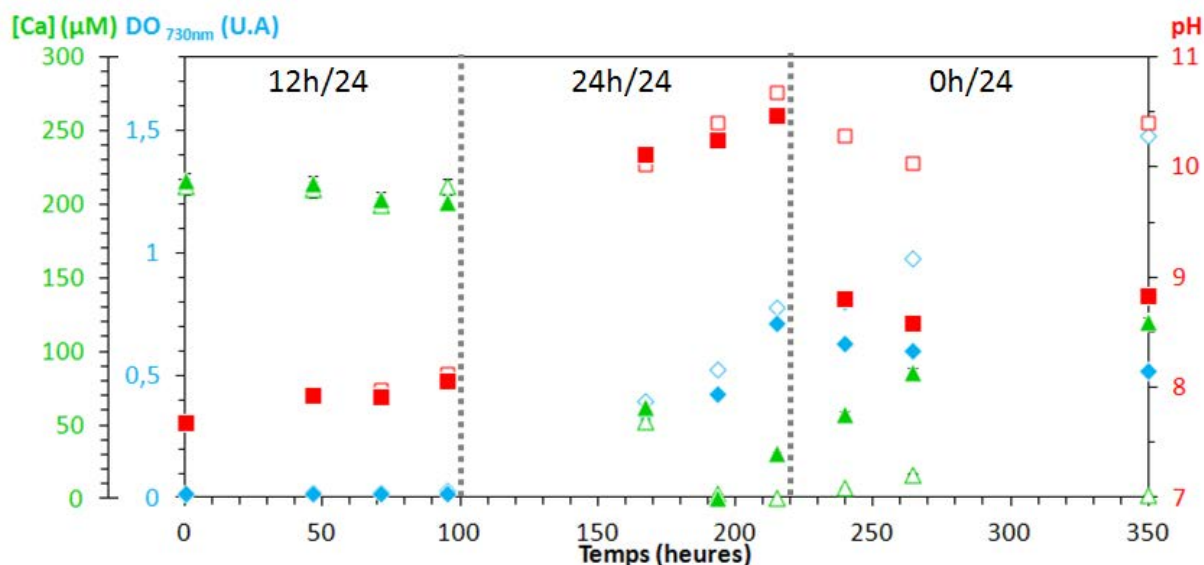


Figure 2.55: Cultures de *T. elongatus* BP-1 dans du BG-11 à 45 °C. Courbes de suivi de la concentration en calcium mesurée par colorimétrie, du pH et de la DO à 730 nm. La culture est placée à l'obscurité à partir de $t = 220$ h après le début du suivi. Les signes vides correspondent à une culture qui est restée après 220 h sous lumière continue.

Durant toute la période où les cultures sont placées en 12h/24 de lumière, les paramètres mesurés ne changent pas. Cette phase de latence est d'une durée similaire à celles observées pour les autres cultures de BP-1. Après 100 h d'incubation, les cultures sont scus lumière continue et comme pour les cultures précédentes de *T. elongatus* BP-1, la concentration en calcium diminue et le pH augmente en 100 h. La vitesse de diminution de la concentration en calcium est similaire à celles observées dans les cultures précédentes (§ 2.3.1) : 2,1 μM de calcium par heure (entre $t = 95$ et $t = 193$ h).

Après 24 h d'absence de lumière le pH est passé de 10,5 à 8,8 et ne varie plus guère ensuite. La DO a légèrement diminué (-10 %). La concentration en calcium augmente jusqu'à la fin des mesures ($t = 350$ h). L'augmentation de la concentration en calcium est de 0,65 μM de calcium par heure sur toute la période sans lumière et atteint la concentration de 120 μM . La moitié du calcium est donc relarguée tandis que la concentration en cellules n'a diminué que de 30 %. La quantité de calcium relarguée est supérieure à celle qui était contenue dans les cellules ayant disparu. D'autre part, le calcium est relargué moins vite qu'il n'a été incorporé par les cellules. Ici l'état physiologique des cellules n'a pas été contrôlé, il est possible que des cellules mortes participent dans l'absorption de la lumière et donc à la valeur mesurée de la DO.

2.5.4. Effet de la diminution du pH dans le milieu sur le relargage du calcium

Une culture de *Thermosynechococcus elongatus* est incubée à 45 °C sous 12h/24 d'illumination dans du BG-11. Après 100 h, la lumière reste allumée en permanence. À

$t = 215$ h, le pH de la culture est diminué en ajoutant de l'acide chlorhydrique. Le pH, la concentration en calcium et la DO de la solution sont suivis tout au long de l'incubation. La Figure 2.56 présente ces résultats et les mêmes paramètres mesurés sur une culture témoins incubée en même temps dans les mêmes conditions mais dans laquelle le pH n'est pas diminué.

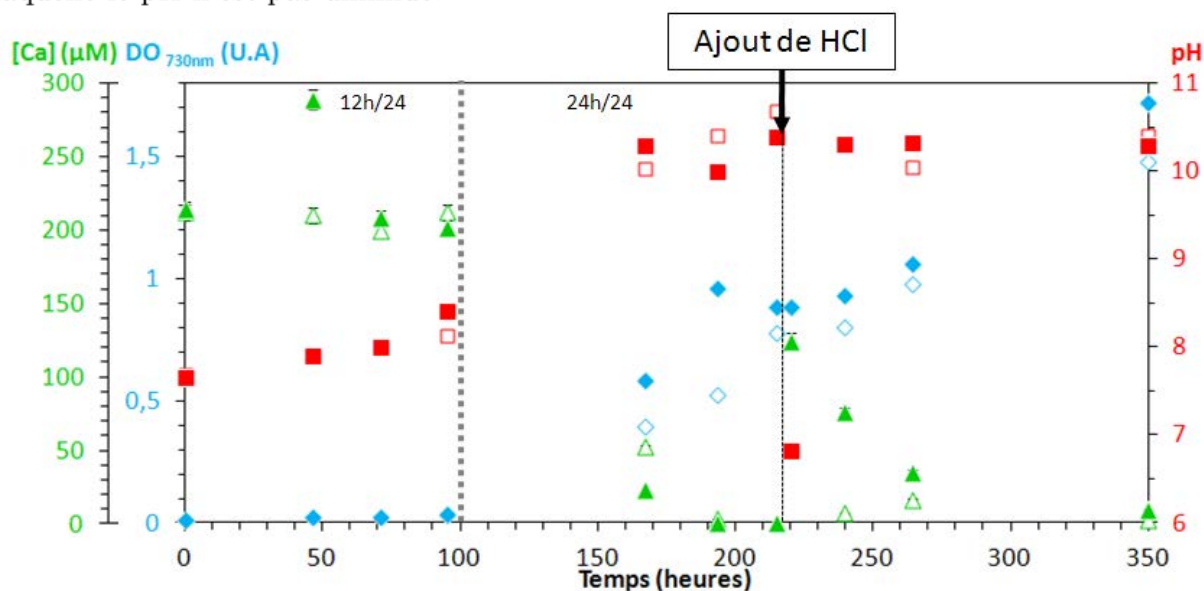


Figure 2.56 : Cultures de *T. elongatus* BP-1 dans du BG-11 à 45 °C. Courbes de suivi de la concentration en calcium mesurée par colorimétrie, du pH et de la DO à 730 nm. 75 μmol de HCl sont ajoutés après 215 h d'incubation, la concentration totale en HCl ajouté est de 1,6 mM. Un relevé est fait juste avant l'ajout d'acide et un juste après. Les signes vides correspondent à une culture qui n'a pas eu d'ajout d'acide.

Comme pour la culture précédente de *T. elongatus* BP-1, la concentration en calcium diminue et le pH augmente en 100 h à partir du moment où la lumière est continue. Contrairement au témoin, la DO stagne une fois la concentration de calcium à son minimum (à partir de $t = 190$ h). À $t = 215$ h, 750 μL d'HCl à 0,1 M sont ajoutés, ce qui correspond à 75 μmol soit une concentration dans la culture d'environ 1,6 mM ; le pH passe de 10,4 à 6,8. De façon immédiate, cette diminution du pH entraîne une augmentation de la concentration du calcium en solution jusqu'à 124 μM.

25 h après l'acidification (240 h après le début de la culture), le pH a ré-augmenté jusqu'à 10,3 (proche de sa valeur avant acidification), la DO a légèrement augmenté et la concentration en calcium a re-diminué jusqu'à 76 μM.

Les jours suivants, le pH reste à son plateau ; le calcium continue de diminuer et la DO d'augmenter. La concentration en calcium diminue à une vitesse similaire à la première décroissance. Lors de la première décroissance le calcium diminue de 2,5 μM par heure (entre 95 et 167 h) et pendant la deuxième de 2,0 μM/h (entre 220 et 264 h).

3. Discussion

Nous avons suivi plusieurs paramètres pendant la croissance de cultures de cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires. Nous soulignons que les 6 souches suivies ont toutes été cultivées dans le même milieu BG-11. Dans toutes ces cultures, la concentration en calcium a diminué plus rapidement (< 400 h) et jusqu'à des concentrations nettement plus basses que dans les cultures de souches qui ne forment pas de carbonate intracellulaire. Cette diminution se fait à des vitesses qui dépendent de la souche (Tableau 2.10). Les concentrations finales varient entre 3 et 13 μM en fonction de la souche. En considérant que la totalité du calcium se retrouve dans les cyanobactéries, cela représente de grandes quantités : la souche *G. lithophora* C7 a montré une incorporation maximale dans nos conditions de plus de 100 mg/g de matière sèche. La diminution de la concentration en calcium observée dans les cultures de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires peut-elle être due à une précipitation dans le milieu externe ? Les phases les plus susceptibles de précipiter sont les carbonates et les phosphates de calcium. Les observations en microscopie électroniques montrent que les zones les plus riches en calcium dans les cellules sont les carbonates. Ces inclusions peuvent comprendre une grande partie du calcium incorporé par les cellules.

Tableau 2.10 : Récapitulatif des données cinétiques et chimiques pour 4 souches de cyanobactéries. IS : Indice de saturation.

souches	<i>Gloeomargarita lithophora</i> C7	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
Présence de carbonates de calcium intracellulaires	Oui	Oui	Oui	Non
Temperature d'incubation	30 °C	30 °C	45 °C	30 °C
Temps de génération initial	102 h	50 h	23 h	38 h
Durée de la phase de décroissance du Ca	375 h	208 h	230 h	-
[Ca] finale dans le milieu externe mesurée (ICP-AES)	2,95 µM	5,87 µM	12,75 µM	62,07 µM
Maximum d'incorporation (mg Ca / g mat. sèche)	109 mg/g	37 mg/g	44 mg/g	21 mg/g
IS maximal dans le milieu extracellulaire pour l'ACC	-1,291	0,202	0,406	0,706
IS maximal dans le milieu extracellulaire pour la calcite	-0,468	1,026	1,193	1,532
IS maximal dans le milieu extracellulaire pour l'hydroxyapatite	6,885	8,852	10,149	10,221

3.1. Le calcium de la solution se retrouve principalement dans les carbonates intracellulaires

La concentration en calcium dans le milieu externe diminue au cours du temps chez les souches qui forment des carbonates intracellulaires.

Une première hypothèse peut être discutée : cette diminution pourrait être due en partie à la précipitation d'une phase minérale dans le milieu extracellulaire. Suivant notre modèle de calcul pour la souche C7, le milieu de culture initial BG-11 est sous-saturé pour tous les carbonates de calcium et est sursaturé pour deux phases comprenant du calcium : la fluorapatite et l'hydroxyapatite. Le fluor ne fait pas partie des composants du milieu mais quelques micromoles par litre sont présents sous forme de contaminants. Cette faible quantité ne suffit pas à expliquer les diminutions de la concentration en calcium (qui sont de l'ordre de 200 µM). Plusieurs arguments suggèrent que la précipitation d'une phase extracellulaire contenant du calcium n'est pas responsable de la diminution constatée du calcium.

Il est bien connu que beaucoup de cyanobactéries peuvent modifier leur milieu de culture et, dans certaines conditions, engendrer la précipitation de carbonates de calcium extracellulaires en exportant le calcium (Waditee et al., 2004) et les ions OH⁻ (Riding, 2006). En effet, dans toutes les cultures de cyanobactéries, le pH du milieu extracellulaire augmente (exportation d'ions hydroxyles vers le milieu extérieur). Les milieux de cultures étant en libre échange avec l'atmosphère, l'élévation du pH augmente les concentrations en HCO₃⁻ et en CO₃²⁻ dans la solution. De plus, à pH plus élevé, la proportion de CO₃²⁻ par rapport au HCO₃⁻ augmente (Figure 2.3). Une plus grande concentration en CO₃²⁻ augmente la saturation pour les phases de carbonates et un pH plus grand augmente les saturations des phosphates de calcium et des carbonates.

Dans plusieurs cultures, la saturation du milieu extracellulaire vis-à-vis de ces phases augmente avec l'âge de la culture. Dans une culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425, le milieu est sursaturé pour des phases de carbonates de calcium (calcite, vaterite, aragonite, ACC) et également pour des carbonates de calcium magnésiens (dolomite, huntite). Par la suite le milieu devient sous-saturé pour ces phases ce qui veut dire que s'il y a eu précipitation, celle-ci est suivie d'une re-solubilisation.

L'augmentation du pH dans un milieu accroît l'indice de saturation du milieu extracellulaire vis-à-vis des polymorphes de carbonates et de l'hydroxyapatite (Figure 2).

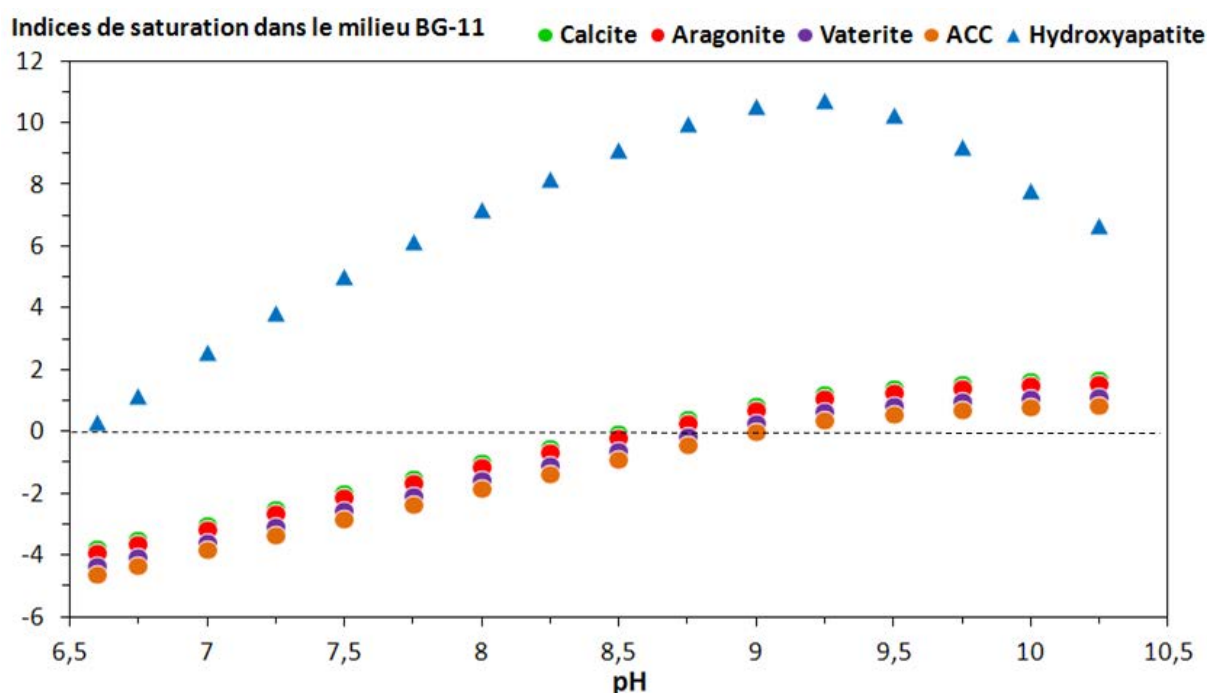


Figure 2.57 : Indices de saturation en fonction du pH du BG-11. Calculs fait avec Visual MINTEQ pour une température de 25 °C, une pression partielle du CO₂ constante de 0,00038 atm.

Or, dans les cultures, l'augmentation du pH et la diminution de la concentration en calcium ne se font pas toujours en même temps. Dans certaines cultures, la diminution de la concentration en calcium précède l'élévation du pH. Le comportement inverse est cependant observé dans d'autres cultures. Dans les cultures de certaines souches (e.g. C7) formant des carbonates de calcium intracellulaires faites dans le même milieu BG-11, le pH augmente lentement pendant que la concentration en calcium diminue. Pour d'autres souches cultivées dans le même milieu, le pH augmente rapidement jusqu'à un plateau et ensuite le calcium diminue (e.g. BP-1).

L'évaluation de la sursaturation du milieu n'est qu'une indication d'une possibilité de précipitation mais pas une condition suffisante. Deux souches ne formant pas de carbonate intracellulaire ont été étudiées (PCC 7942 et PCC 73106). Pour PCC 7942, les saturations pour les différentes phases de carbonates et phosphate de calcium sont plus élevées que dans les cultures de souches formant des carbonates intracellulaires. Et pourtant la concentration en calcium extracellulaire ne diminue pas autant et le pH augmente jusqu'à 10 unités. Pour PCC 73106, malgré l'atteinte d'un pH du 10 dans le milieu extracellulaire et donc une sursaturation vraisemblablement élevée (nous n'avons pas pu la calculer car nous n'avons pas mesuré dans ce cas l'alcalinité), la concentration en calcium reste à peu près constante. Cela montre que les sursaturations atteintes vis-à-vis de l'hydroxyapatite ou des carbonates n'impliquent pas forcément la précipitation massive de ces phases dans BG-11. La diminution de la concentration en calcium dans le BG-11 n'est visible que dans les cultures de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires.

Il est donc peu probable que la précipitation externe contribue de manière significative à la diminution du calcium en solution. L'adsorption sur les cellules ne devrait pas jouer non plus un rôle prédominant. En effet, Bundelewa et al. (2014) ont déterminé une concentration maximale de calcium adsorbé à la surface de cyanobactéries (*Gloeocapsa* sp.) de 20-30 $\mu\text{mol/g}$ de matière sèche. Pour comparer, la souche *G. lithophora* C7 a montré un maximum d'incorporation, dans nos conditions, de plus de 100 mg/g de matière sèche soit 2500 $\mu\text{mol/g}$ de matière sèche.

C'est finalement l'observation directe en microscopie électronique qui fournit les informations les plus directes sur le devenir du calcium soustrait par les bactéries à la solution. Pendant la croissance des cultures, des observations en STEM ont été faites sur plusieurs souches formant des carbonates intracellulaires et une qui n'en forme pas. Dans toutes ces cultures, que la concentration en calcium soit basse ou non, et que le pH soit élevé ou non, aucun précipité extracellulaire contenant du calcium n'a été observé. Parfois des silicates de magnésium (*T. elongatus* BP-1) ou des phases riches en soufre, phosphore et fer ont été observées mais sans calcium.

Les observations en STEM nous montrent aussi que le calcium est très concentré dans les carbonates intracellulaires. La quantité de ces carbonates par cellule semble

relativement constante, tandis que le nombre de cellules augmente. On en conclut que la diminution de la concentration en calcium du milieu est surtout due à la formation de nouveaux carbonates intracellulaires riches en calcium. Une autre partie du calcium se retrouve dans les polyphosphates (quand ceux-ci ne contiennent pas seulement du magnésium et du potassium), une autre possiblement associée/compléxée par les protéines intracellulaires et enfin une dernière en surface des cyanobactéries.

3.2. La formation de carbonates intracellulaires est un processus actif

Une condition nécessaire mais non suffisante pour qu'il y ait précipitation d'une phase dans un milieu est que celui-ci soit sursaturé vis-à-vis de cette phase. La phase amorphe de carbonate de calcium (ACC) est une des plus solubles et nécessite donc une saturation plus grande que la calcite ou l'aragonite par exemple. Les analyses du milieu de culture (milieu extracellulaire) des cyanobactéries indiquent que, pour au moins une souche (C7), ce milieu est constamment sous-saturé pendant l'incorporation du calcium. Or, les cyanobactéries contiennent des inclusions de carbonates de calcium. Ce qui veut dire que leur milieu intracellulaire, ou tout au moins le compartiment de formation des carbonates (s'il est séparé du cytosol) est (sur)saturé par rapport à la phase d'ACC. Il y a donc une différence entre le milieu extracellulaire sous-saturé et le milieu intracellulaire qui est à minima saturé vis-à-vis de l'ACC. Il y a une surconcentration du calcium et/ou des carbonates (potentiellement liée au pH) dans les cellules. Les mécanismes biologiques permettant des échanges d'espèces chimiques à travers la membrane contre le gradient de concentration nécessitent l'utilisation d'énergie. Ces processus sont dit « actifs », par opposition avec l'entrée ou la sortie d'espèces chimiques selon leur gradient qui sont de la diffusion ou des transports « passifs ».

La saturation d'une solution dépend de l'activité des espèces présentes. En solution diluée (milieu de type BG-11), les activités sont proches des concentrations. Or, le cytosol de cellule est un milieu concentré, les activités sont donc plus faibles que les concentrations. Le milieu intracellulaire est donc d'autant plus sur-concentré par rapport à la solution extracellulaire.

La saturation du milieu intracellulaire vis à vis du carbonate de calcium amorphe pourrait être due à un ou plusieurs parmi trois paramètres : 1) une concentration plus grande du calcium, 2) une concentration plus grande du carbone inorganique (HCO_3^- et CO_3^{2-} confondus) et 3) un pH plus élevé, qui augmente la proportion de CO_3^{2-} .

En prenant les valeurs maximales intracellulaires suggérées par la littérature pour la concentration en calcium (2,6 μM ; Barrán-Berdón et al., 2011), la concentration en carbone inorganique (30 mM ; Badger et Andrews, 1982) et le pH (7,9 ; Belkin et

Boussiba, 1991), le cytosol est largement sous-saturé pour la phase de carbonate de calcium amorphe (indice de saturation de -2,225). Les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires ont donc au moins un de ces trois paramètres différents. D'après ce qui est connu dans la littérature, la concentration en carbone inorganique est très vraisemblablement supérieure dans la cellule par rapport au milieu extérieur (4-5 mM dans le milieu de culture de C7). Ce processus actif entre en jeu dans la sursaturation du milieu intracellulaire. Il fait intervenir plusieurs types de mécanismes connus sous le terme générique de CCM pour « carbon concentrating mechanisms » (e.g., Badger and Price, 2003) notamment permettant un transport actif d'ions bicarbonate vers l'intérieur de la cellule via des transporteurs. Ce qui est plus surprenant c'est que dans les cyanobactéries en général, un mécanisme d'export actif du calcium est décrit qui régule le calcium aux concentrations basses infra- μM évoquées ci-dessus. Il reste à savoir par conséquent quelle concentration du calcium est aussi nécessaire dans les cyanobactéries formant les carbonates intracellulaires.

Si on calcule la valeur minimale d'un des paramètres nécessaires pour que la saturation soit atteinte, tout en gardant les deux autres paramètres constants, on arrive à la conclusion qu'une concentration en calcium supérieure à 441 μM permet d'atteindre la saturation avec un pH de 7,9 et une concentration en carbone inorganique de 30 mM. En revanche, si l'on conserve une concentration en calcium de 2,6 μM , même 450 mM de carbone inorganique dans un milieu de pH 13 ne permettent pas d'être à saturation (au-delà, la force ionique du milieu dépasse 1 M et le logiciel ne permet pas de déterminer une saturation). Cette concentration en calcium est donc insuffisante pour permettre la formation du carbonate de calcium amorphe. Dans le milieu BG-11, la concentration en calcium est initialement de 245 μM et diminue jusqu'à 3 μM dans les cultures de la souche C7. Si le pH et la quantité de carbone inorganique intracellulaire sont les mêmes que celles mesurées dans d'autres cyanobactéries, alors le calcium est forcément plus concentré dans le milieu intracellulaire (ou bien le compartiment dans lequel se forme les carbonates) que dans le milieu extracellulaire. Cette hypothèse est en contradiction avec les données connues sur les cyanobactéries. Les souches de cyanobactéries capables de former des inclusions de carbonate pourraient concentrer activement le calcium, alors que la plupart des cellules l'exportent activement au contraire via des transporteurs échangeant Ca^{2+} et H^+ et/ou Ca^{2+} et Na^+ ou des ATPases permettant un transport primaire du Ca^{2+} par exemple. Faut-il imaginer que de tels transporteurs fonctionnent à l'envers dans les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires ? Ou bien ces carbonates intracellulaires sont isolés du cytosol dans des compartiments, et des transporteurs y concentrent activement le calcium par rapport au cytosol avec éventuellement une augmentation aussi du pH.

Un autre argument pour l'aspect actif de la formation de carbonate intracellulaire est apporté par l'expérience où une culture de *T. elongatus* BP-1 est placée à l'obscurité. Sans lumière, le calcium de la solution n'est plus incorporé par les cellules ; il est même

relargué. La photosynthèse est une source d'énergie pour les cyanobactéries. Le fait que la lumière soit nécessaire à l'incorporation du calcium implique peut-être que l'énergie qui en est issue contribue à la saturation du milieu intracellulaire même s'il faut souligner que la photosynthèse n'est évidemment pas la seule source d'énergie dans une cellule (cf. respiration oxygénique par exemple). De la même façon, il a été montré que la concentration du carbone inorganique dans les cyanobactéries dépend de la lumière (Price et al., 1992; Kaplan and Reinhold, 1999). D'autres mécanismes d'internalisation du calcium ont été étudiés chez les cyanobactéries : Pandey et al. (1996) ont mesuré l'importation du calcium chez la souche *Nostoc* MAC en présence de différents inhibiteurs et découplants (empêche le transfert de l'énergie entre les enzymes d'oxydoréduction et l'ATP). Ils concluent que cette importation dépend de l'énergie produite par la photosynthèse. L'utilisation de cette énergie pour stocker du calcium ne vient pas forcément du transport à travers la membrane plasmique car l'importation se fait de manière passive, c'est à dire selon le gradient de concentration. Mais le transfert du cytoplasme vers le réservoir peut demander une dépense d'énergie.

L'effet de la lumière sera, d'ailleurs, discuté dans le paragraphe suivant.

La précipitation de carbonates intracellulaire nécessite donc un processus actif de la cellule. Cela signifie que, quand la cellule meurt et que l'équilibre entre l'intérieur et l'extérieur se rétablit, les carbonates intracellulaires se dissolvent vraisemblablement même si cela restera à vérifier proprement. Les observations en STEM montrent une partie des cellules sans inclusions (~15 %). Il est possible que ces cellules soient mortes/non viables ou qu'elles aient en tous cas perdu cette capacité à développer le processus actif et que leur milieu intracellulaire ne soit plus suffisamment saturé.

En résumé, les espèces de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires présentent des mécanismes qui engendrent des conditions de concentration en calcium, de pH ou/et de concentration en carbone inorganique libres suffisantes pour que la précipitation d'ACC se produise. Ce déséquilibre ne peut être permis que par des procédés de concentration actifs de l'extérieur vers l'intérieur des cellules, possiblement au sein de compartiments intracellulaires.

3.3. Quels sont les paramètres qui régissent l'incorporation du calcium ?

Certains éléments de réponse à cette question sont fournis par la mesure des vitesses d'incorporation du calcium par les cellules. Ces vitesses ne sont pas constantes, elles changent au cours de la culture.

3.3.1. La concentration en calcium

Dans la plupart des cultures, la vitesse d'incorporation a diminué avec le temps. Le calcium est incorporé, sa concentration extracellulaire diminue également. La vitesse d'incorporation du calcium semble corrélée linéairement avec la concentration en calcium en dessous d'une certaine concentration seuil au moins. Ce que l'on sait sur les bactéries qui ont été étudiées dans le passé, c'est que le calcium entre de façon passive et que la régulation de la concentration interne se fait par l'exportation active du calcium vers le milieu extracellulaire (Waditee et al., 2004). Des gènes codant pour des transporteurs échangeant des Ca^{2+} et des H^+ sont présents dans les génomes de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires (communication personnelle de David Moreira) mais leur expression n'a pas été vérifiée jusqu'ici.

Au niveau de la membrane plasmique des cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires, il y a vraisemblablement un flux entrant et un flux sortant de calcium. Pendant l'incorporation du calcium, le flux entrant est supérieur au sortant et quand il n'y a plus d'incorporation alors les deux flux se compensent. La concentration finale en calcium dans le milieu extracellulaire correspond donc à un équilibre qui internalise le calcium à la même vitesse que celui-ci est exporté par la cellule. La concentration finale dans les cultures de la souche BP-1 est plus grande que celle des cultures de PCC 7425 qui est plus grande que dans les cultures de C7 (Tableau 2.10). L'agent responsable de l'internalisation spécifique du calcium a donc une affinité plus grande (pour le calcium) chez C7 que chez PCC 7425 et plus grande chez PCC 7425 que chez BP-1. Il est également possible que ces cyanobactéries aient des mécanismes de blocage des transporteurs qui exportent le calcium.

A contrario, une expérience sur la souche *T. elongatus* BP-1 dans laquelle deux ajouts de calcium sont faits, montre que la vitesse d'incorporation du calcium ne devient pas plus importante avec l'augmentation de la concentration en calcium (§ 2.5.1). Ceci montre que la vitesse d'incorporation ne dépend pas uniquement de la concentration en calcium dans le milieu extracellulaire.

3.3.2. La lumière

La souche *T. elongatus* BP-1 cesse d'incorporer le calcium quand elle ne reçoit plus de lumière (§ 2.5.3). Ces cyanobactéries ont besoin de lumière pour accumuler le calcium qui se retrouvera dans les carbonates. Il semble donc y avoir un lien entre les mécanismes de la photosynthèse chez ces bactéries et la formation des carbonates intracellulaires. Thompson et Ferris (1990) ont montré que la précipitation de calcite dans le « Green Lake » (Fayetteville, USA) était due à l'activité photosynthétique de cyanobactéries. Ils ont cultivé une souche de cyanobactérie *Synechococcus* sp. dans de l'eau filtrée du lac en présence de lumière ou à l'obscurité. Seule la culture sous lumière présente un pH élevé et des précipités de calcite dans le milieu externe. Leur conclusion est que l'activité photosynthétique des cyanobactéries entraîne une

basification du milieu et par là une sursaturation suffisante pour précipiter de la calcite.

Il a été montré que l'activité photosynthétique des cyanobactéries est associée à l'incorporation massive de carbone inorganique et à l'exportation d' OH^- ce qui augmente le pH du milieu extracellulaire (Riding, 2006). Ainsi la précipitation de carbonates de calcium extracellulaires est liée à la photosynthèse. Il semble que la précipitation intracellulaire dépende aussi de la lumière.

D'autres mécanismes d'internalisation du calcium ont été étudiés chez les cyanobactéries : Pandey et al. (1996) ont mesuré l'importation du calcium chez la souche *Nostoc* MAC en présence de différents inhibiteurs et découplants (empêche le transfert de l'énergie entre les enzymes d'oxydoréduction et l'ATP). Ils concluent que cette importation dépend de l'énergie produite par la photosynthèse.

Néanmoins le lien entre la précipitation intracellulaire avec la photosynthèse est peut-être très différent et reste à définir.

3.3.3. Le pH

Pendant la croissance des cultures de cyanobactéries, le pH extracellulaire augmente. Cette augmentation est parfois relativement bien corrélée temporellement avec l'incorporation du calcium (C7 et PCC 7425, § 2.1.1 et § 2.2.1) et parfois non (BP-1 et PCC 6312, § 2.3.1 et Annexe 2). Il est possible que cela dépende de la souche, ce qui voudrait dire qu'il y a des différences dans les mécanismes de formation des carbonates intracellulaires. L'augmentation du pH extracellulaire et la formation des carbonates pourraient être reliées directement ou bien indirectement via l'activité des cellules : les cellules photosynthétiquement actives induisent l'augmentation du pH intracellulaire et en même temps la production d'énergie associée permet la formation de carbonates de calcium intracellulaires. En prenant des conditions initiales différentes (i.e. pH et $[\text{Ca}]$), il est possible qu'on ne retrouve pas la synchronicité de l'augmentation du pH et de la diminution de la concentration en calcium dans le milieu.

Ce que nous pouvons dire c'est que la variation de la vitesse d'incorporation de calcium n'est pas reliée de façon simple à la valeur du pH. Nous avons vu que le pH pouvait augmenter de 7,6 à 10 au cours de la croissance. L'incorporation du calcium peut donc avoir lieu à des pH variés. Pourtant la diminution imposée de celui-ci (jusqu'à 6,5) entraîne un relargage du calcium. Il peut y avoir un seuil de pH minimal pour que les cellules puissent prendre le calcium extracellulaire, qui serait compris entre 6,5 et 7,6. Une autre possibilité est que l'acidification brutale a agi comme un stress pour les cellules qui a conduit incidemment à un relargage (par exemple via la quantité d'énergie disponible pour le processus actif que constitue le stockage du calcium).

3.4. Les avantages évolutifs de la formation de carbonates de calcium intracellulaires

3.4.1. La diminution de l'alcalinité exportée

Les saturations du milieu extracellulaire vis-à-vis des phases de carbonates de calcium sont plus importantes dans les cultures de la souche *Synechococcus elongatus* PCC 7942, souche ne formant pas de carbonate intracellulaires. Cette espèce n'incorpore pas le calcium de la même façon que celles qui forment des carbonates intracellulaires, la concentration en calcium diminue beaucoup moins. On voit aussi la concentration en calcium rester élevée dans les cultures de l'autre souche témoin étudiée, *Gloeocapsa* sp. PCC 73106. Le pH lui en revanche augmente de manière comparable, voire plus dans le milieu de culture de ces souches. La différence de saturation vient de la concentration en calcium mais aussi de la concentration en carbone inorganique dans le milieu. Les concentrations du milieu extracellulaire atteignent plus de 6,5 mM pour le HCO_3^- et plus d'1 mM pour le CO_3^{2-} dans une culture de PCC 7942 alors qu'elles sont respectivement deux fois et dix fois moins élevées dans les cultures de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires. Les calculs des quantités de carbone inorganique dissous dans du BG-11 en fonction du pH (Figure 2.3) montrent que les quantités mesurées dans toutes les cultures sont en dessous de l'équilibre avec l'atmosphère. Il semble donc que les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires piègent plus de carbone que les autres. Ainsi la formation de carbonates intracellulaires est associée à une diminution de la saturation en carbonate de calcium dans le milieu de culture en limitant les concentrations en calcium et en carbone inorganique.

La sursaturation de la solution extracellulaire vis-à-vis de phases de carbonate de calcium peut entraîner une précipitation autour des cyanobactéries. On voit ainsi des cyanobactéries dans le milieu naturel qui peuvent complètement s'encroûter dans les carbonates (e.g., Couradeau et al., 2013; Gérard et al., 2013). D'autres cellules comme les bactéries ferro-oxydantes peuvent s'encroûter dans des minéraux (Miot et al., 2009). Et certaines espèces ont des mécanismes qui empêchent cet encroûtement. La bactérie *Mariprofundus ferrooxydans* forme des précipités de fer et de polymère organique en forme de tiges (Chan et al., 2011). Cette précipitation est contrôlée par la cellule et localisée à un endroit précis de sa surface. Ce mécanisme permet à la bactérie de ne pas être piégée dans un précipité de fer. Les bactéries phototrophiques ferri-oxydantes génèrent à leur périphérie un pH plus faible que le milieu environnant. Cette acidité permet d'éviter la précipitation du fer à la surface de la cellule ce qui diminuerait les échanges avec le milieu et ferait écran à la lumière (Hegler et al., 2010). La formation de carbonates de calcium intracellulaire peut être un mécanisme empêchant la formation de carbonates de calcium autour de la cellule. Les cyanobactéries diminuent la concentration en calcium et limite l'alcalinité du microenvironnement les entourant

ce qui, du coup, limite la saturation pour les phases de carbonates de calcium dans leur environnement et donc diminue la formation de calcite.

3.4.2. Le stockage de calcium et de carbone

Ici nous avons décrit les premières cinétiques d'incorporation du calcium dans différentes espèces de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires. Les observations faites en STEM sur les cellules et les analyses ICP-AES du milieu permettent d'avoir une idée des quantités de calcium fixées, et de leur localisation principale. Les zones intracellulaires les plus riches en calcium sont les carbonates. Le reste doit être réparti dans d'autres compartiments comme les polyphosphates intracellulaires, la surface des cellules ou le cytosol. Les carbonates intracellulaires de ces bactéries peuvent contenir de grandes quantités de calcium et servir de stockage. Le calcium est un élément abondant qui est impliqué dans de nombreux phénomènes biochimiques autant chez les eucaryotes (Campbell, 2014) que chez les procaryotes (Smith, 1995). Notamment, le calcium participe au fonctionnement de la photosynthèse comme cofacteur du cluster Mn_4 dans le complexe d'oxydation de l'eau du photosystème II (Debus, 1992). Ce complexe enzymatique permet la récupération d'électrons à partir de molécules d'eau : de là vient la production de l'oxygène par la photosynthèse oxygénique.

Peu de structures intracellulaires ont la capacité de stocker le calcium. Il existe des organelles appelées acidocalcisomes qui sont présents chez des organismes très variés comme des algues, des eucaryotes parasites et des cellules humaines (Docampo et al., 1995; Docampo and Moreno, 2001; Docampo et al., 2005). Seufferheld et al. (2003) ont identifié une structure similaire chez une proteobactérie. Cet acidocalcisome est caractérisé par sa nature acide, une haute densité aux électrons et contient principalement du phosphore sous forme de polyphosphate et du calcium. Le calcium y est incorporé de manière active par une ATPase qui échange un ion Ca^{2+} avec des protons. Deux pompes à proton, une ATPase et une pyrophosphatase maintiennent l'acidité de l'acidocalcisome. Le calcium peut être relargué via une autre protéine qui fait entrer des protons en faisant sortir un ion Ca^{2+} de l'organelle (Vercesi and Docampo, 1996). La fonction de l'acidocalcisome n'est pas clairement établie : il jouerait un rôle dans la régulation du pH, de l'osmolarité du cytosol et permettrait le stockage de phosphore et de calcium (Docampo et al., 2005). Le phosphore est nécessaire à la synthèse de nucléotide et le calcium peut être utilisé comme signal dans certaines cellules.

Contrairement à l'acidocalcisome qui est acide, les carbonates nécessitent plutôt des milieux basiques pour précipiter. La formation de carbonate de calcium intracellulaire peut être une forme de stockage de calcium qui pourrait être libéré si besoin comme signal.

Nous avons vu que le calcium incorporé par la souche *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 pouvait être relargué dans le milieu en l'absence de lumière ou lors d'un stress acide dans le milieu. Ce calcium est donc bien labile. Les phases amorphes sont plus solubles que les phases cristallines, ce qui les rend moins stables (Radha et al., 2012; Kellermeier et al., 2014) et donc plus facilement solubilisables. Ce qui argumente en faveur de la réutilisation possible du calcium par les cellules et donc à une réelle fonction de stockage du calcium des carbonates intracellulaires.

Ces carbonates de calcium intracellulaires sont formés de carbone inorganique et de calcium. Si l'on prend par exemple la souche C7, les cellules contiennent environ $0,050 \mu\text{m}^3$ de CaCO_3 soit environ 1 fmol par cellule (si l'on prend $d = 2,18 \text{ g.cm}^{-3}$ pour un carbonate monohydraté ; Fernandez-Martinez et al., 2013 et $M_{\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}} = 118 \text{ g.mol}^{-1}$). Une cellule mesure environ $1 \mu\text{m}$ de large pour $3 \mu\text{m}$ de long soit un volume de $2,1 \mu\text{m}^3$. Ce qui fait que la concentration en carbonates correspondante est d'environ 473 mM ($\sim 427 \text{ mM}$ pour le calcium en comptant la quantité de magnésium) dans le milieu intracellulaire. Cette concentration est donc plus de 10 fois plus grande que celles du carbone inorganique mesurées dans des cyanobactéries par Badger et Andrews (1982) (30 mM). Ces carbonates intracellulaires représentent une grande source de calcium et de carbone inorganique dans les cellules. Il resterait à démontrer si ce carbone inorganique peut être remobilisé par la cellule lorsque sa concentration intracellulaire devient limitant pour la photosynthèse. On sait que la RuBisCO est une enzyme peu efficace, nécessitant de fortes activités de CO_2 pour assurer la fixation du carbone. Ceci est la raison pour laquelle des mécanismes de concentration du carbone (CCM) actifs, c'est-à-dire nécessitant de l'énergie ont été sélectionnés par l'évolution chez les cyanobactéries (Badger and Price, 2003). On voit ici que la formation des carbonates de calcium, qui constitue un réservoir important de carbone inorganique, pourrait ainsi participer à ces mécanismes de concentration du carbone.

3.5. La diversité dans les cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires

Il y a deux types de phénotypes de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires du point de vue de l'arrangement spatial de ces inclusions : les carbonates peuvent être localisés aux extrémités de la cellule ou dispersés dans le cytoplasme (Benzerara et al., 2014). Dans les deux cas, aucun compartiment contenant un ou plusieurs carbonates n'a été encore observé. Cependant, il est à souligner qu'il s'agit d'une tâche compliquée puisque le contraste d'une éventuelle membrane est très faible en microscopie électronique par rapport à celui d'un carbonate. Nos expériences ont montré que chaque souche étudiée incorporait le calcium à des vitesses et des

quantités différentes (Tableau 2.10) et qu'elles abaissent la concentration du calcium extracellulaire à des seuils très bas mais légèrement différents dans le même milieu (BG-11). Cette diversité suggère des différences dans les mécanismes de formation des carbonates ou dans l'incorporation du calcium ou bien des différences quant à l'affinité pour le calcium. De plus en observant les cyanobactéries en microscopie électronique, on voit une grande variabilité dans le nombre et la taille des inclusions de carbonates de calcium formées pour les cellules d'une même souche.

Les comptages des inclusions cellulaires faites en microscopie électronique ont montré une grande variabilité. Par exemple, les mesures faites sur la culture de la souche C7 ayant reçu un ajout de calcium montrent une quantité moyenne de carbonate plus grande que la même culture sans calcium ajouté. Mais la spectrométrie XANES, faites sur de grandes quantités de cellules ne révèle pas de différence entre les deux cultures. En microscopie nous sommes sensibles aux variations entre les cellules et en effet il y a toujours une certaine proportion de cellules vides (~15 %). Nous ne savons pas si cette partie de la population sont des cellules mortes, dans une phase de non production de carbonate ou bien si cela vient d'une hétérogénéité phénotypique : bien qu'ayant un génotype similaire, les cellules peuvent en effet avoir des phénotypes différents (Zimmermann et al., 2015).

4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons, pour la première fois, caractérisé l'évolution des paramètres du milieu de culture pendant la formation de carbonates de calcium intracellulaires par plusieurs espèces de cyanobactéries. Cela nous a permis de quantifier l'incorporation du calcium dans les cellules pour plusieurs souches formant des carbonates. Les vitesses et les quantités diffèrent selon les souches dans un même milieu.

La formation de carbonates de calcium intracellulaires est associée à une diminution du calcium extracellulaire et parallèlement l'activité biologique des cellules entraîne une augmentation du pH. La solution de culture peut rester sous-saturée pour les phases de carbonates de calcium. Ce qui montre que cette précipitation intracellulaire est un processus actif de la cellule et qu'il ne s'effectue que lorsqu'elle est métaboliquement active.

La cinétique d'incorporation du calcium n'est pas directement liée au pH extracellulaire mais la lumière et donc l'activité photosynthétique semble indispensable pour l'incorporation du calcium. Le calcium peut aussi être relargué dans le milieu lors d'un stress acide ou une période d'obscurité. Également le lien entre l'incorporation du calcium et la concentration en calcium du milieu extracellulaire n'est pas clair. L'incorporation du calcium est limitée à une concentration non nulle de calcium extracellulaire et cette concentration n'est pas la même pour toutes les souches.

5. Perspectives

5.1. L'effet de la lumière

Les résultats indiquent que la lumière est nécessaire pour stocker le calcium et former les carbonates intracellulaires. Cela ne signifie pas forcément que les carbonates sont dégradés en absence de lumière. Une expérience montre un relargage durant une période de nuit mais la viabilité des cellules n'a pas été vérifiée. Dans la plupart de nos expériences, les cultures étudiées étaient éclairées en continu afin d'accélérer les croissances des cultures. Cependant, dans la nature les cyanobactéries sont dans un environnement jour/nuit et possèdent des carbonates intracellulaires. Si les cyanobactéries incorporent le calcium et forment des carbonates le jour à un certain taux, qu'en est-il la nuit ? À quelle vitesse le calcium est-il relargué en absence de lumière et comment cela se compare-t-il avec l'incorporation du jour ? Des cultures suivies en cycle jour/nuit permettront de mieux savoir dans quelles mesures le calcium incorporé est relargué et ce que devient la saturation du milieu pour les carbonates.

De plus, le lien probable entre la formation de carbonates intracellulaires et la photosynthèse reste à définir.

L'autre intérêt de cultures en séquence jour/nuit est le fait que toutes les cellules présentes dans la culture sont synchronisées sur les périodes d'illumination. S'il existe une étape particulière de formation de carbonates, en observant les cellules en STEM, il sera possible de déterminer la proportion de cellules vides et pleines.

L'expérience sur la culture de cyanobactéries placée à l'obscurité a permis de voir le relargage du calcium. Cette expérience a été faite sur une seule souche de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires. Il faut donc reproduire cette expérience de relargage sur d'autres espèces formant des carbonates intracellulaires pour confirmer que toutes ont cette capacité de relargage et voir les différences de vitesse et de réservoirs (carbonates, polyphosphate ou autre) vidés.

5.2. Les différences de mécanismes avec les cyanobactéries ne formant pas de carbonates intracellulaires

Les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires accumulent fortement le calcium. Pour mieux identifier les acteurs de cette accumulation, il faut tester différentes molécules qui bloquent certains types spécifiques de transporteurs ou de canaux ioniques.

Également pour répondre à la question du lien avec le système de concentration du carbone il faut regarder soit dans les génomes ou par marquage spécifique si les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires présentent les mêmes gènes et enzymes permettant l'importation active du carbone inorganique, identifiés dans le système de concentration du carbone, que les cyanobactéries ne formant pas de carbonate intracellulaire.

Les cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires génèrent-elles moins d'alcalinité dans le milieu extracellulaire ? Pour répondre, il faut normaliser l'alcalinité produite par les cellules à leur activité photosynthétique. Il faut donc suivre la quantité d'oxygène produite (activité photosynthétique) dans un bioréacteur tout en mesurant l'alcalinité (exportation d'ions hydroxyles). On pourra donc voir si, pour une même quantité de CO₂ concentré dans le milieu intracellulaire, les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires exportent moins de OH⁻ dans le milieu de culture.

5.3. La composition du milieu intracellulaire

Des mesures faites sur des cyanobactéries ne contenant pas de carbonates montrent que le pH intracellulaire est régulé à des valeurs proches de la neutralité (<8). La concentration en ions calcium non complexés est régulée à de faibles concentrations (~100 nM) dans beaucoup de cellules (Barrán-Berdón et al., 2011). Or, si le milieu intracellulaire des cyanobactéries est riche en ion HCO₃⁻ (Badger and Andrews, 1982),

la concentration en calcium et le pH connue du milieu intracellulaire des cyanobactéries ne permettent pas la précipitation de carbonates. Il y a donc un paradoxe apparent qui témoigne surtout du fait que l'on connaît encore peu les conditions dans lesquelles se forment ces carbonates intracellulaires. Il faudrait donc déterminer le pH, la concentration en calcium libre et la quantité de carbone inorganique libre dans le cytoplasme. Il existe beaucoup de molécules fluorescentes qui permettent de déterminer la concentration en calcium ou le pH intracellulaire. Un problème méthodologique est que les cyanobactéries ont une fluorescence propre qui se superpose avec le signal de certaines molécules disponibles. Il faut donc contourner cette autofluorescence pour quantifier le pH et la concentration en calcium. Ensuite il faut incuber les cyanobactéries avec la molécule sélectionnée (avec ou sans perméabilisation des membranes selon le type de molécule) et déterminer le pH ou la concentration en calcium par cytométrie. De la microscopie confocale permettrait de déterminer si des conditions permettant la précipitation (pH et concentration en calcium élevés) sont réunies de façon localisée dans les cellules. Un autre problème est l'échelle à laquelle se développent les conditions nécessaires pour la biominéralisation. Si c'est au sein de nanocompartiments, alors nous serons limités par ces approches. Enfin, il a été décrit que l'introduction de telles sondes fluorescentes pouvait perturber les systèmes biologiques et les valeurs mesurées peuvent ne pas être représentatives des conditions physiologiques réelles. L'introduction de gènes rapporteurs a été proposée comme une solution pour la mesure du calcium intracellulaire mais nécessite de pouvoir faire de la génétique sur les souches concernées (Torrecilla et al., 2000).

5.4. Identification et rôles des différents réservoirs

Nous avons vu qu'une partie de la quantité de calcium pris par les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires ne se retrouve pas dans les carbonates. Cette quantité devrait se retrouver dans les polyphosphates également présents dans les cellules, dans le cytosol et adsorbée à la surface des cellules. Des analyses en STXM (microscopie en absorption des rayons x) peuvent permettre de quantifier les différents rapports en calcium selon les zones intracellulaires. Si l'on couple ce type d'analyse avec le suivi d'une culture, on peut réussir à déterminer les échanges possibles entre ces réservoirs selon les différentes phases observées de croissance et d'incorporation.

Chapitre 3 : Étude de l'incorporation de strontium (Sr) et de baryum (Ba) dans les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires

1. Introduction

Ce chapitre 3 vise à mieux comprendre, par une approche cinétique du processus, la présence de relativement grandes quantités de strontium et de baryum observées dans les inclusions carbonatées des cellules de *Gloeomargarita lithophora* (Couradeau et al., 2012).

Gloeomargarita lithophora (souche C7) a été isolée d'un aquarium dans lequel ont été cultivés des microorganismes venant du lac Alchichica au Mexique. Les carbonates intracellulaires observés dans les cellules ayant été cultivées dans les aquariums avaient une composition particulièrement riche en strontium et en baryum, à savoir $(\text{Mg}_{0,18}\text{Ca}_{0,53}\text{Sr}_{0,8}\text{Ba}_{0,21})\text{CO}_3$, formule que l'on peut comparer à la composition de l'eau de l'aquarium dont les caractéristiques sont les suivantes :

$[\text{Ca}] = 47 \mu\text{M}$;

$[\text{Sr}] = 12 \text{ nM}$;

$[\text{Ba}] = 1,5 \text{ nM}$.

Les rapports Sr/Ca et Ba/Ca sont ainsi respectivement de 591 et 12 415 fois supérieures dans ces carbonates comparés au milieu extracellulaire. Cette observation ainsi que l'étude présentée dans le chapitre 1 de ma thèse conduisent à la suggestion que parmi les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires, la souche *G. lithophora* C7 a la capacité de concentrer préférentiellement le strontium et le baryum par rapport au calcium dans les carbonates intracellulaires formés. Cependant, cette mise en évidence de l'incorporation préférentielle de baryum et de strontium a été faite dans une solution (ici de l'aquarium) avec une composition chimique particulière qui est de plus tamponnée par la dissolution des morceaux de roche disposés au fond. D'autres microorganismes que *G. lithophora* sont présents dans l'aquarium et pourraient interférer avec le processus de concentration en strontium et baryum et nous ne pouvons pas contrôler l'état physiologique des cellules de *G. lithophora*. Enfin, il reste à savoir si les autres souches de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires concentrent elles aussi préférentiellement le strontium et le baryum par rapport au calcium.

Le strontium et le baryum, comme le calcium, sont des alcalino-terreux. Leurs configurations électroniques sont donc similaires mais ils diffèrent par leurs masses molaires ($40,01 \text{ g.mol}^{-1}$ pour le calcium, $87,62 \text{ g.mol}^{-1}$ pour le strontium et $137,33 \text{ g.mol}^{-1}$

pour le baryum) et par leurs rayons ioniques effectifs (rayons ioniques non solvatés : 1,06 Å pour le Ca^{2+} , 1,21 Å pour le Sr^{2+} et 1,38 Å pour le Ba^{2+} (Shannon, 1976). Cette similarité avec le calcium permet au strontium et au baryum de substituer ce dernier élément dans les mécanismes biologiques (Bihler et al., 1986). Par exemple Boussac et al. (2014) ont montré que, lorsque le calcium est remplacé par du strontium dans le milieu de culture de la cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, Sr se substitue intégralement à Ca au niveau du complexe d'oxydation de l'eau du photosystème II. Le strontium se substitue aussi à une partie du calcium dans la précipitation abiotique de calcite, aragonite et ACC (cf. Chapitre 1).

Cette incorporation de strontium dans des carbonates de calcium est une voie très étudiée pour la dépollution du ^{90}Sr (Fujita et al., 2004; Achal et al., 2012; Lauchnor et al., 2013). En effet l'isotope 90 du strontium est un polluant majeur lors de certaines fuites radioactives (Vakulovsky et al., 1994; Fukuda et al., 2014). Au vu de la différence du rapport Sr/Ca et Ba/Ca entre les carbonates que forment *G. lithophora* C7 et le milieu (Couradeau et al., 2012), il semble que cet organisme a de grandes capacités de sélection et de séquestration du strontium et du baryum. Cette aptitude pourrait être utilisée pour dépolluer des environnements contaminés. Partant de ce constat, notre objectif a été de développer une démarche analytique systématique basée sur le contrôle de différents paramètres physico-chimiques (concentration, température, lumière) pour l'étude de l'incorporation du strontium et du baryum dans différentes souches de cyanobactéries.

Nous nous sommes posé plusieurs questions :

1) Quelle est l'évolution de la composition des carbonates intracellulaires par rapport à celle du milieu de culture ? Les taux d'incorporation du strontium et du baryum dans les carbonates dépendent-ils, comme pour les précipités abiotiques, de leurs concentrations relatives au calcium dans le milieu ?

2) Le strontium et le baryum modifient-ils la vitesse de précipitation des carbonates intracellulaires ?

3) l'accumulation du strontium et du baryum dans les carbonates par les cyanobactéries est-elle dépendante de la lumière comme vu dans le chapitre 2 ?

Enfin, 4) Cette capacité d'accumulation sélective est-elle inhérente à la précipitation de carbonates intracellulaires ? Notamment, les autres souches de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires incorporent-elles également sélectivement le baryum et le strontium ?

Pour répondre à ces questions, nous avons suivi la croissance de 4 souches formant des carbonates intracellulaires : *G. lithophora* C7, *Cyanothece* sp. PCC 7425,

Synechococcus calcipolaris G9 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 dans le milieu BG-11 auquel nous avons dans certains cas ajouté du strontium et du baryum. Le milieu BG-11 est un milieu souvent utilisé pour la culture de cyanobactéries d'eau douce : il contient peu de molécules organiques et est riche en nitrate et en phosphate (Matériel et Méthodes §1.3). Rappelons que les souches C7 et PCC 7425 forment des inclusions de carbonate dispersées dans la cellule, tandis que G9 et PCC 6312 présentent des inclusions au niveau des extrémités de la cellule et parfois au niveau du septum de division (Benzerara et al., 2014). Les carbonates résultants ont été observés en microscopie électronique en transmission et leur composition élémentaire est analysée par spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie (EDXS). Elle est comparée à la composition chimique de la solution de culture analysée en ICP-AES (Matériel et Méthodes, §2.1.2).

2. Résultats

2.1. Incorporation du strontium et du baryum par la souche

Gloeomargarita lithophora C7

2.1.1. Culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 μM de strontium et de baryum sous lumière continue à 30 °C

L'incorporation du strontium, du baryum et du calcium par la souche C7 a été suivie en étudiant la croissance bactérienne dans un milieu dérivé du BG-11 dont nous avons ajusté la composition chimique, notamment en strontium et en baryum. Afin de suivre l'évolution temporelle des concentrations extracellulaires en strontium et en baryum pendant le stockage par les cellules, il est nécessaire de travailler avec des concentrations supérieures à la limite de quantification par l'ICP-AES (0,068 μM pour le strontium et 0,22 μM pour le baryum sur la mesure). Par ailleurs, le milieu contient des sulfates (305 μM), et la baryte (sulfate de baryum) est très peu soluble ($K_s = 1,1 \cdot 10^{-10} \text{ M}^2$, Moore et al., 2009). On peut calculer qu'à partir de 1,5 μM de baryum dans le milieu BG-11, l'indice de saturation^a de la baryte est positif. Nous avons choisi des concentrations intermédiaires de 50 μM pour le strontium et de 50 μM pour le baryum (soit 345 μM de $[\text{Ca}^{2+}] + [\text{Sr}^{2+}] + [\text{Ba}^{2+}]$). Les trois éléments sont introduits sous forme de chlorures. Dans ces conditions, l'indice de saturation du milieu pour la phase de baryte est de 1,53 à 30 °C et les indices de saturation pour la calcite, la strontianite (SrCO_3) et la withérite (BaCO_3) sont respectivement -1,74 ; -1,64 et -2,34. Trois cultures de *Gloeomargarita lithophora* C7 ont été réalisées à 30 °C sous lumière continue. La première culture a été réalisée seule à un instant donné tandis que les deux autres cultures sont des duplicats réalisés à un autre instant. La première culture et les deux répliques sont donc préparés à partir de pré-cultures différentes. La densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 730 nm et le pH de la culture ainsi que les concentrations en calcium, strontium et baryum (ICP-AES) ont été suivis au cours du temps. Les méthodes d'analyse sont mentionnées dans la partie Matériel et Méthodes.

La Figure 3.1 montre la croissance cellulaire et l'évolution du pH des trois cultures de *Gloeomargarita lithophora* C7. Dans les trois graphiques, la DO augmente ce qui signifie que le nombre de cellules augmente, et le pH augmente aussi en raison de l'activité des cyanobactéries. On remarque que ce pH semble stagner dans les deux répliques (B et C) puis augmente à partir de 350 h. Le pH de la culture A augmente lentement de façon similaire à ce qui se passe dans les cultures de C7 dans BG-11 sans

^a Défini comme le logarithme décimal du produit des activités des différentes espèces moins le logarithme décimal de la constante de solubilité de la phase.

strontium ou baryum (cf. Chapitre 2, §2.1). La Figure 3.2 présente les concentrations de calcium, strontium et baryum en solution (c'est-à-dire dans la fraction $< 0,22 \mu\text{m}$; cf. Matériel et Méthodes, §1.4) en fonction du temps dans les trois cultures de *G. lithophora* C7. Ces trois graphiques montrent globalement les mêmes profils dans les décroissances des trois éléments. Au moment de l'inoculation de la culture ($t = 0$), les concentrations sont proches de celles du milieu de culture préparé trois jours plus tôt ($245 \mu\text{M}$ de calcium, $50 \mu\text{M}$ de strontium et $50 \mu\text{M}$ de baryum). Par conséquent, aucun de ces trois éléments n'a formé de précipité sous forme de sulfate dans le milieu.

Dans un premier temps, la concentration en baryum diminue jusqu'à devenir indétectable après 150 h environ ; alors que celle du strontium n'évolue pas significativement et que celle du calcium diminue d'environ 10 %. Une fois la concentration en baryum en dessous de la limite de détection de l'ICP-AES (0,3 ppb sur la mesure soit $0,065 \mu\text{M}$ en tenant compte de la dilution), la concentration en strontium diminue sans que celle du calcium ne change. Vers $t = 220\text{-}250$ h, la concentration en strontium passe à son tour sous la limite de détection (0,14 ppb sur la mesure soit $0,046 \mu\text{M}$ en tenant compte de la dilution). À ce moment là seulement, la concentration en calcium se met à diminuer.

Il y a donc une séparation temporelle dans l'incorporation du calcium, du strontium et du baryum. De manière systématique les cellules prélèvent d'abord le baryum, puis le strontium et enfin le calcium. Si l'on compare la décroissance de la concentration du calcium avec celle observée dans la culture de la même souche C7 dans un milieu BG-11 sans strontium ni baryum^b (cf. Chapitre 2, §2.1), on remarque que l'incorporation du calcium débute avec un décalage d'environ 220 h, soit le temps correspondant à peu près à l'incorporation quasi totale du strontium et du baryum.

^baprès correction des différences dans la durée de la phase de latence des courbes de croissance.

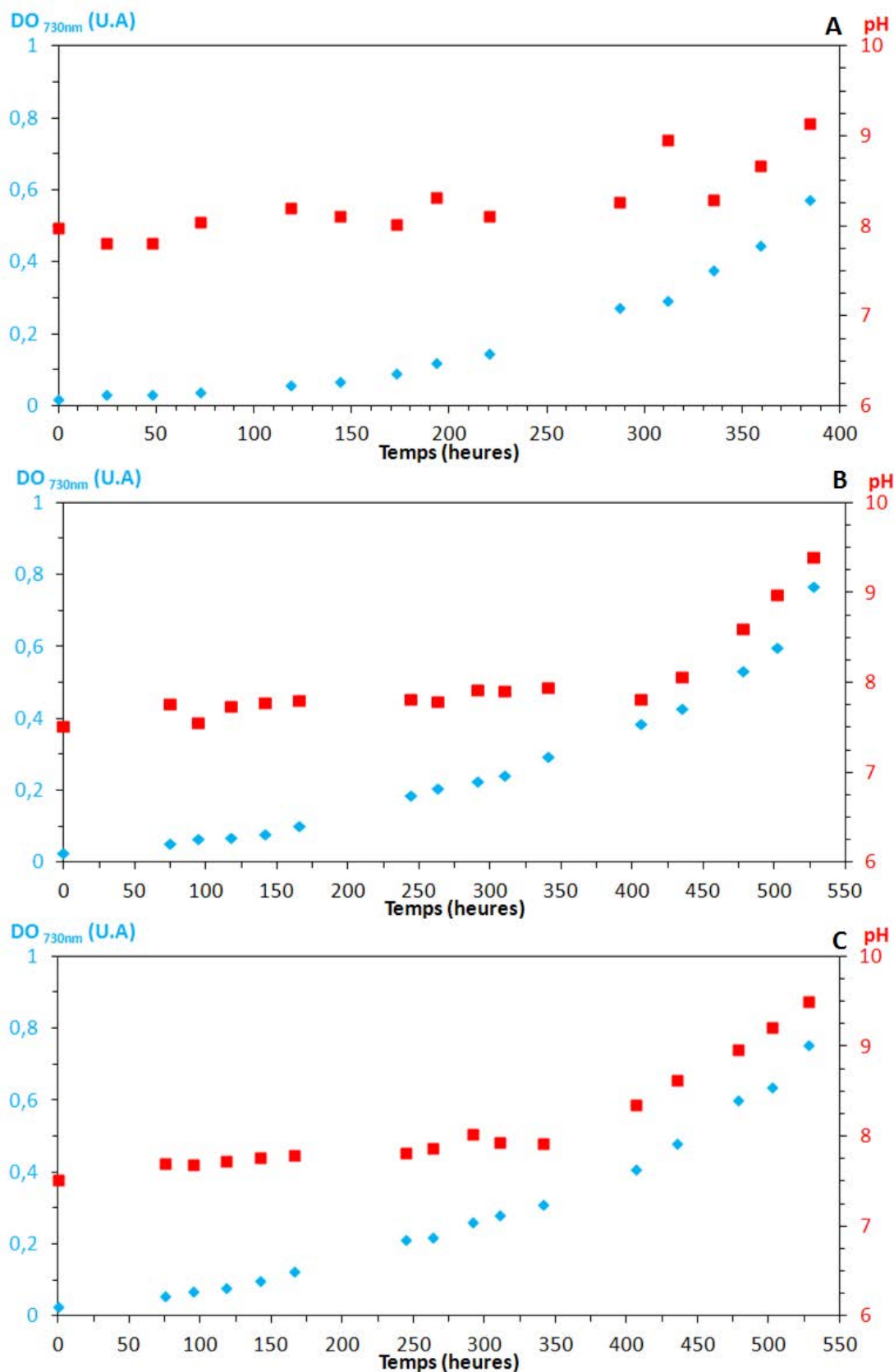


Figure 3.1 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 μ M de strontium et 50 μ M de baryum. Suivi de la DO à 730 nm (en bleu) et du pH (en rouge) du milieu. Les graphiques A, B et C correspondent à 3 cultures, les cultures B et C sont des réplicas inoculés à partir de la même pré-culture.

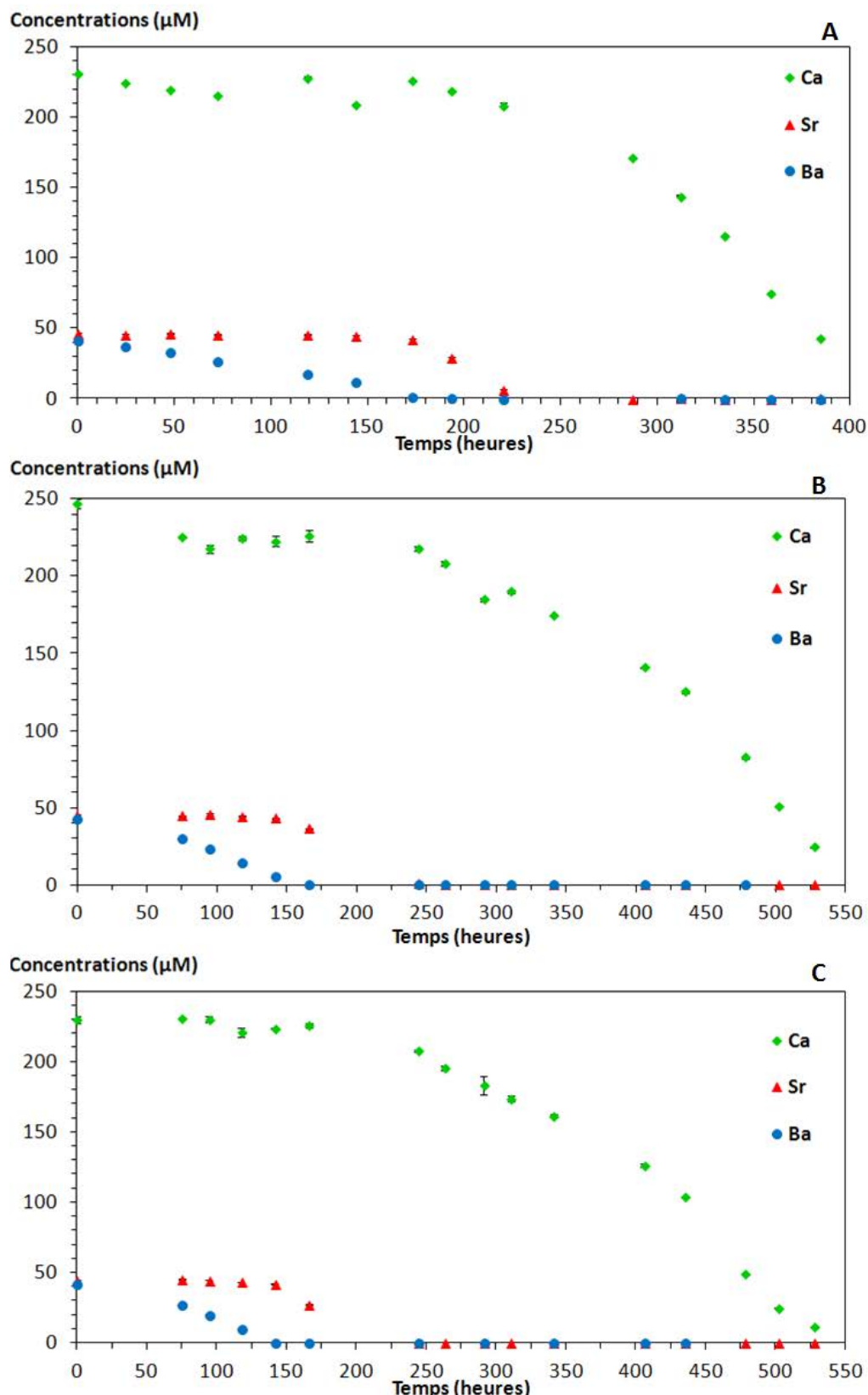


Figure 3.2 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. Suivi en ICP-AES des concentrations de calcium, strontium et baryum dans le milieu extracellulaire. Les graphiques A, B et C correspondent à 3 cultures, les cultures B et C sont des répliques inoculés avec la même pré-culture. Les barres d'erreur non visibles sont plus petites que les symboles.

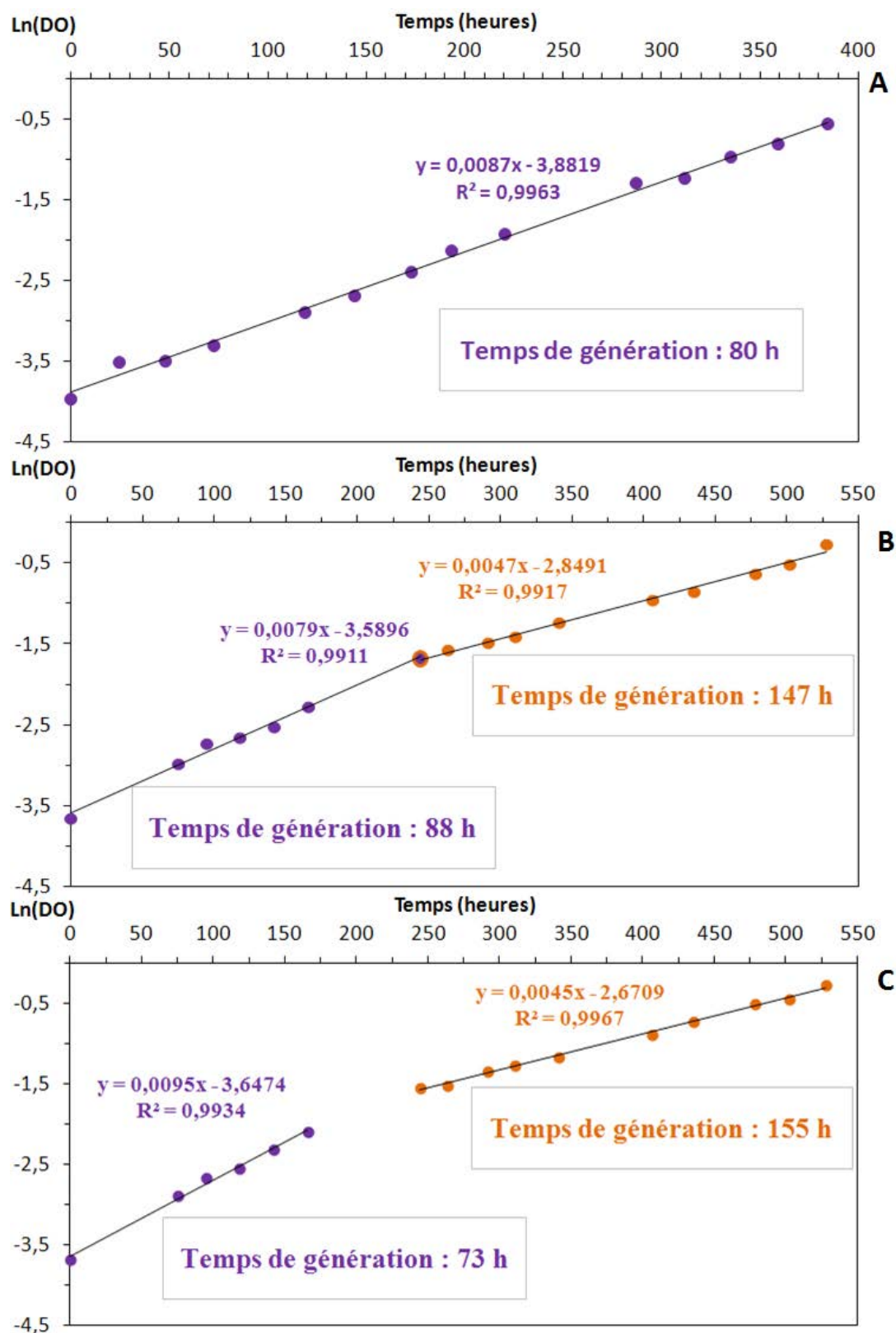


Figure 3.3 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. Logarithme népérien de la DO durant la croissance. Les graphiques A, B et C correspondent à 3 cultures, les cultures B et C sont des répliques inoculés avec la même pré-culture. Temps de génération = $\ln(2)/\text{pente}$.

La Figure 3.3 présente le logarithme de la DO en fonction du temps. Cette représentation permet de déterminer le temps de génération de la culture. Celui-ci est d'environ 80 h. Pour les 2 répliques, B et C, ce temps augmente à 150 h environ après 250h de culture. Ceci coïncide avec le moment où il n'y a plus de baryum ni de strontium dans le milieu.

Des comptages de cellules ont permis d'établir la relation entre la densité optique de la solution et le nombre de cellules (cf. Matériel et Méthodes, §1.2). En normalisant la diminution de la concentration d'un élément donné entre deux mesures par le nombre moyen de cellules entre ces deux points, on peut déterminer des vitesses d'incorporation par cellule.

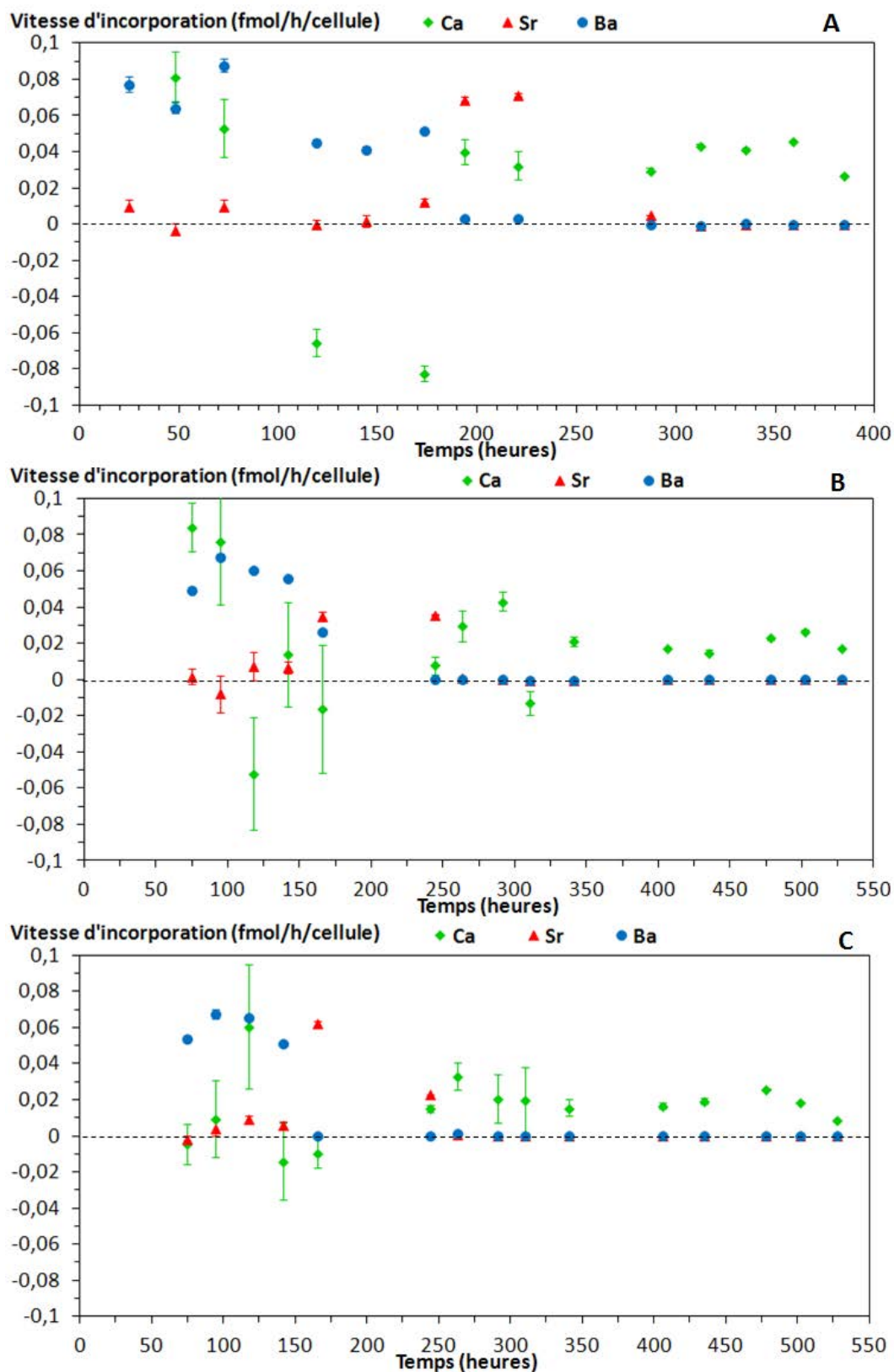


Figure 3.4 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 μ M de strontium et 50 μ M de baryum. Vitesses d'incorporation par cellule du calcium, du strontium et du baryum dans les cultures A, B et C.

La Figure 3.4 présente les vitesses d'incorporation par cellule du calcium, du strontium et du baryum en fonction du temps dans les trois cultures. Le calcium semble pris puis relargué au début de la croissance de la culture mais les vitesses calculées lors de cette phase initiale sont incertaines car elles correspondent à de faibles variations relatives de sa concentration. Les différentes phases d'incorporation sont bien visibles. Il semble y avoir des différences entre les vitesses maximales d'incorporation des trois éléments. Chaque cellule prend en moyenne $0,058 \pm 0,015$ fmol de baryum par heure puis $0,049 \pm 0,021$ fmol de strontium par heure et $0,026 \pm 0,010$ fmol de calcium par heure^c. La vitesse d'incorporation des différents éléments diminue au cours du temps. Une telle diminution a également été vue dans les cultures sans strontium ni baryum dans le milieu BG-11 (cf. Chapitre 2, §2.1). Par conséquent, ces variations de vitesse d'incorporation pourraient être liées à un paramètre qui évolue en fonction du temps plutôt qu'à la nature même du cation.

Par ailleurs, les vitesses d'incorporation de chaque élément (calcium, strontium et baryum) déterminées dans les trois cultures sont présentées en fonction de leur concentration respective dans la Figure 3.5. La vitesse d'incorporation du calcium ne semble pas dépendre de sa concentration en solution. L'incorporation trop rapide du strontium par rapport à notre pas d'échantillonnage limite le nombre de points calculés ; on ne peut donc pas déterminer s'il y a une corrélation entre la vitesse d'incorporation de celui-ci et de sa concentration. Quant à la vitesse d'incorporation du baryum, elle semble augmenter avec la concentration. Néanmoins, la gamme de concentration (0-50 μM) est trop faible pour conclure avec certitude.

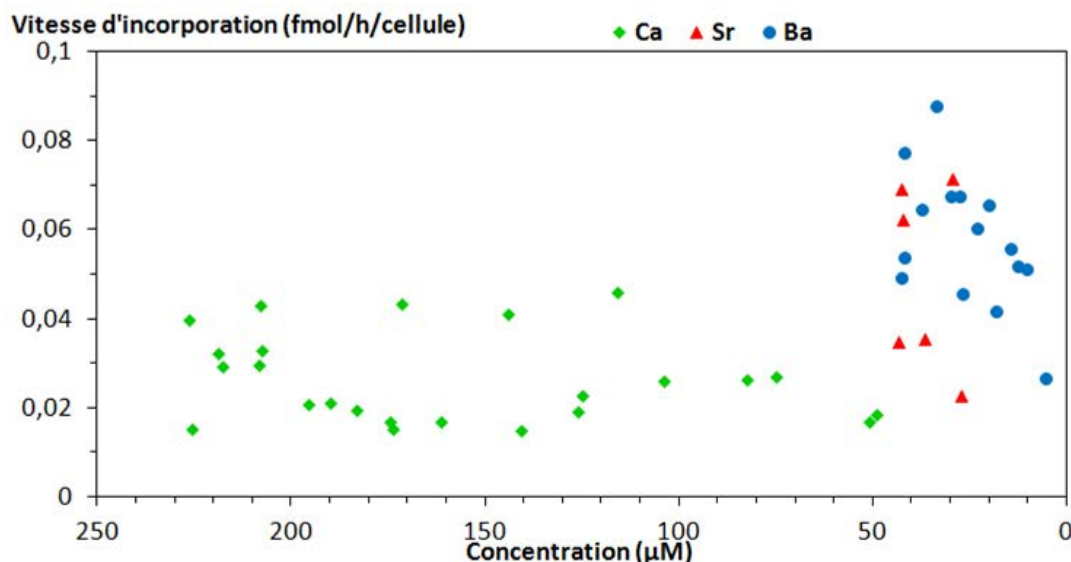


Figure 3.5 : Cultures de *G. lithophora* C7 dans le BG-11 avec 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. Seules les valeurs correspondantes aux phases de décroissances des 3 différentes cultures sont prises en compte. Pour plus de visibilité, les barres d'erreur ne sont pas montrées.

^c Seules les valeurs correspondantes aux phases de décroissances sont prises en compte.

Des pesées de culots cellulaires ont permis de déterminer la masse moyenne d'une cellule pour différentes souches (cf. Matériel et Méthodes, §1.2). Ainsi nous pouvons déterminer en chaque point de la courbe de croissance, la quantité massique d'élément incorporé par masse sèche de cellules. La Figure 3.6 présente les quantités incorporées de calcium, strontium et baryum par unité de masse sèche de cellule au cours de la croissance.

Au fur et à mesure que la culture croît, les quantités de baryum et de strontium diminuent en solution et donc augmentent dans les cellules. Dans certains cas (notamment le Ba dans la courbe A), un plateau apparaît, correspondant sans doute à un contenu optimal par masse cellulaire. Mais une fois que la quasi-totalité d'un élément se retrouve dans les cellules, le pourcentage massique de ces éléments ne peut que diminuer car les cellules continuent de se diviser sans pouvoir continuer à internaliser ces éléments. Dans l'expérience présente, l'incorporation du baryum peut représenter plus de 17 % de la masse des cellules à environ 150 h d'incubation de la culture.

En parallèle du suivi des concentrations en calcium, strontium et baryum dans le milieu extracellulaire, les cellules ont été observées en microscopie électronique en transmission.

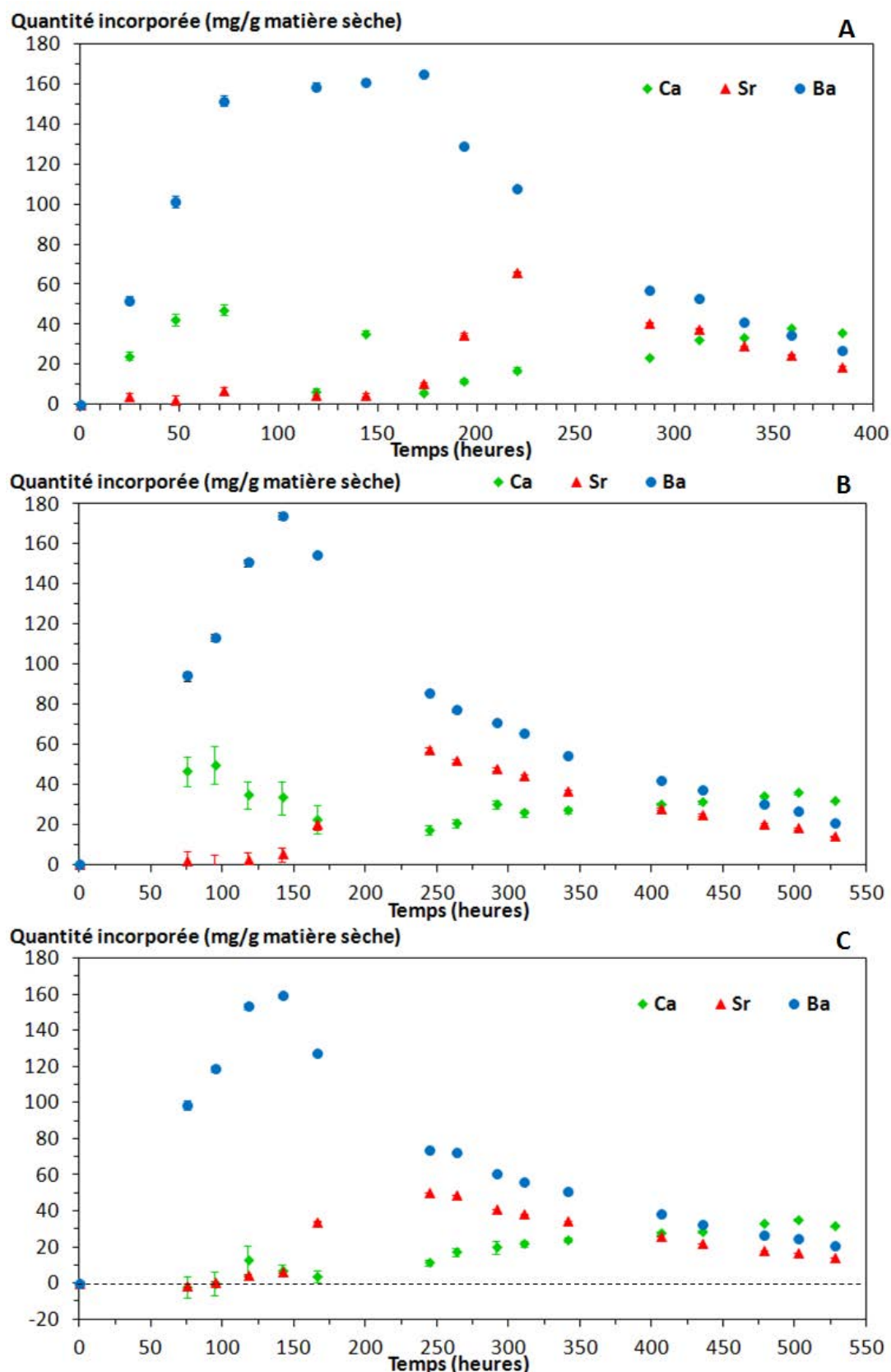


Figure 3.6 : Cultures *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 μ M de strontium et 50 μ M de baryum. Quantités d'ions incorporés par masse de matière sèche, estimées à partir de la DO de la culture, dans les cultures A, B et C.

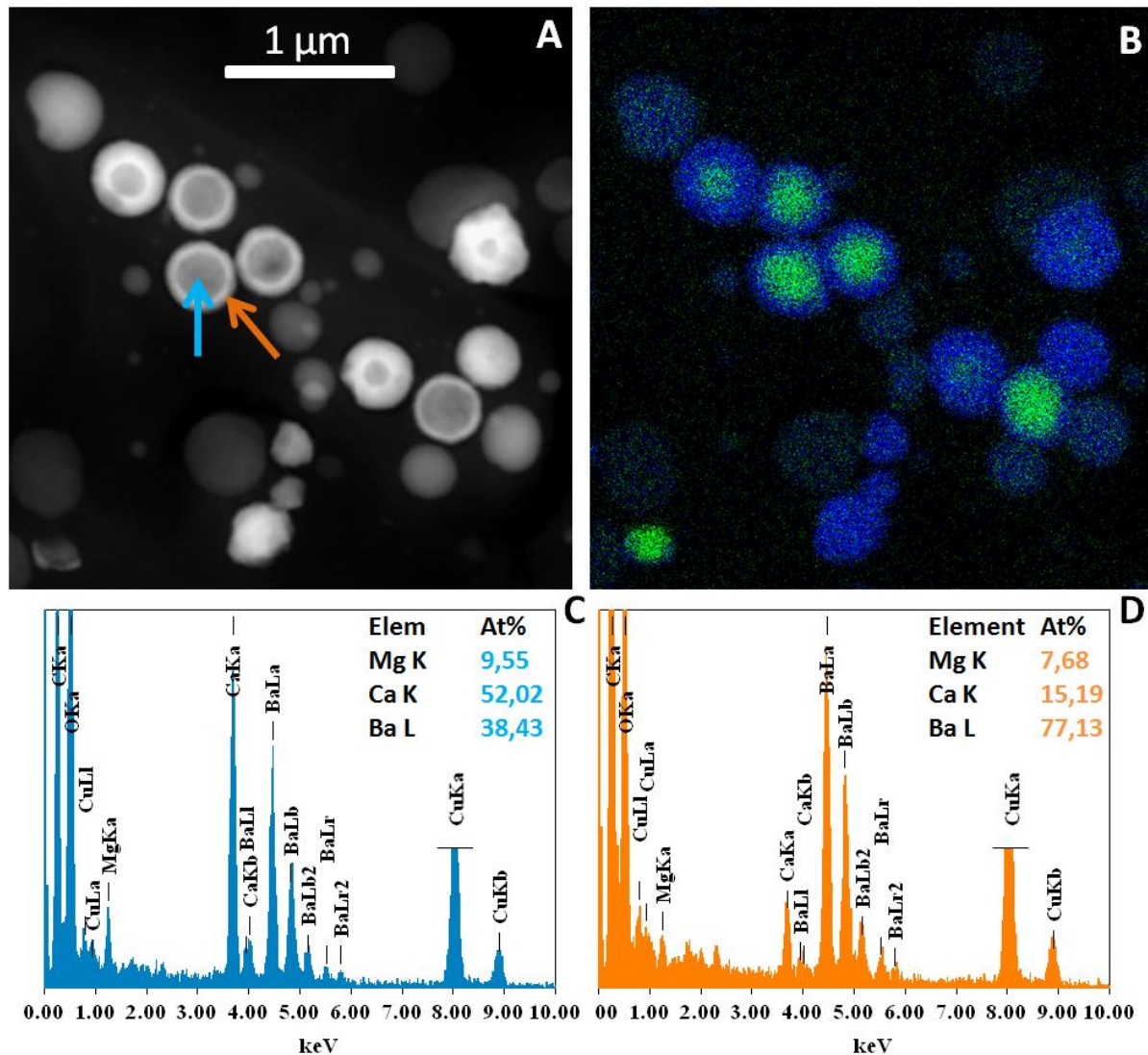


Figure 3.7 : Culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 µM de strontium et 50 µM de baryum, prélevée à t = 75 h. (A) Image en STEM HAADF. (B) Cartographie EDXS correspondante. (C) Spectre EDXS correspondant au cœur d'une particule. (D) Spectre EDXS correspondant à sa couronne.

La Figure 3.7 montre le suivi en microscopie électronique en transmission à balayage (STEM) de la composition élémentaire des inclusions de carbonates après 75 h, c'est à dire à un moment où les cellules internalisent sélectivement le baryum. Dans la culture étudiée, la DO a doublé au bout de 75 h. On observe donc, en microscopie, les cellules filles de celles qui ont été inoculées dans le milieu. Les cellules inoculées provenaient d'un milieu BG-11 sans strontium ni baryum et contenaient donc des carbonates de calcium. Dans les cellules prélevées à 75 h, on peut voir des carbonates formés d'un cœur entouré d'un anneau plus dense aux électrons. L'analyse EDXS de la zone externe de ces particules montre un signal prédominant de baryum, tandis que l'analyse de la partie centrale montre des signaux de calcium et de baryum. En fait le cœur de particule est sans doute un carbonate de calcium pur, mais nous observons sur le plan

de la photographie la projection d'un objet tridimensionnel, donc l'analyse de la zone centrale montre le signal du cœur mais aussi celui de la coquille qui le recouvre.

La coquille de carbonate de baryum autour des carbonates de calcium n'est pas présente sur toutes les inclusions : dans la population observée (31 inclusions), 20 % des inclusions sont des carbonates de calcium purs, 55 % sont formées d'un cœur de calcium et d'une couche de baryum et 25 % sont des carbonates de baryum purs. Il y a donc de nouvelles inclusions de carbonate de baryum, qui se forment suite à un épisode de nucléation indépendant d'une croissance sur des inclusions préexistantes. D'autre part, du carbonate de baryum s'est formé autour de 73 % des carbonates de calcium initialement présents dans les cyanobactéries. Grâce au contraste entre les différentes couches, on peut mesurer l'épaisseur formée. On constate que l'épaisseur de la coquille est constante pour une même particule, ce qui suggère une croissance radiale et uniforme de ces particules intracellulaires. Nous avons aussi comparé les épaisseurs déposées sur des particules différentes: à $t = 75$ h, la couche de baryum formée a une épaisseur d'environ 80 ± 34 nm^d (61 ± 10 nm sur les carbonates de calcium supérieurs à 200 nm). Plus précisément, la Figure 3.8 reporte l'épaisseur de la coquille de baryum en fonction de celle du cœur de carbonate de calcium sur lequel elle s'est formée. La dispersion des épaisseurs de couches de baryum est plutôt hétérogène, et négativement corrélée à celle du cœur : plus le carbonate de calcium central est grand et plus la couche de baryum formée est fine. Il semble par ailleurs qu'il y ait une certaine constance du volume de carbonate de baryum par inclusion. En moyenne une couche de carbonate de baryum correspond à environ $0,0190 \pm 0,0058$ μm^3 ($0,0176 \pm 0,0037$ μm^3 sur les carbonates de calcium supérieurs à 200 nm)

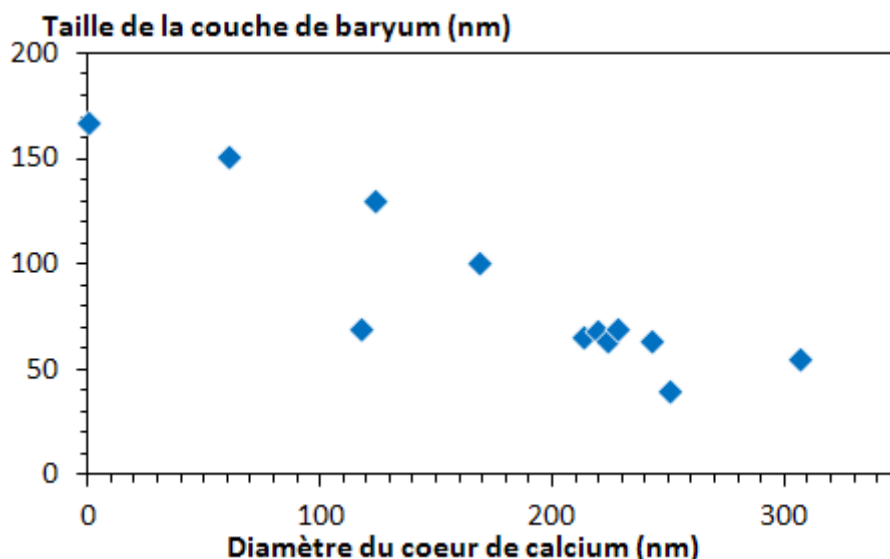


Figure 3.8 : Analyse en STEM-EDXS des carbonates présentant un cœur riche en calcium et une couronne riche en baryum: épaisseur de la coquille riche en baryum en fonction du diamètre du cœur.

^d Mesures faite sur 11 particules

Par ailleurs, on calcule d'après les données de chimie des solutions que chaque cellule a incorporé en moyenne 2,79 fmoles de baryum ; dans l'hypothèse où tout le baryum est incorporé dans les carbonates^e, chaque cellule devrait contenir 0,151 μm^3 de carbonates de baryum. Par microscopie électronique en transmission nous pouvons dénombrer les volumes de chaque inclusion^f. Le nombre de carbonates cartographiés est trop limité pour pouvoir déterminer un volume de baryum moyen par cellule contenu dans les carbonates. Nous pouvons mesurer avec plus d'exactitude le volume moyen total de carbonate (calcium et baryum confondu) par cellule. Il vaut $0,064 \pm 0,043 \mu\text{m}^3$, et si tous les carbonates étaient des carbonates de baryum cela correspondrait à un peu d'un tiers du baryum pris par les cellules. Ce résultat est concordant avec ce qui est observé dans les cellules cultivées dans du BG-11 sans strontium ni baryum ajouté (cf. Chapitre 2, §2.1). Seule une partie des alcalino-terreux se retrouve dans les carbonates, le reste est peut-être localisé dans les polyphosphates et/ou complexé par des protéines. Les polyphosphates sont visibles dans les cellules et ont été analysés en EDXS en même temps que les carbonates. Ces polyphosphates contiennent effectivement du baryum.

^e Le volume molaire est obtenu en calculant la densité d'un carbonate de Ba amorphe à partir de la densité d'un carbonate de Ca amorphe (Fernandez-Martinez et al., 2013) corrigée par le rapport des masses molaires Ba/Ca.

^f Mesure faite sur 435 particules dans 90 cellules.

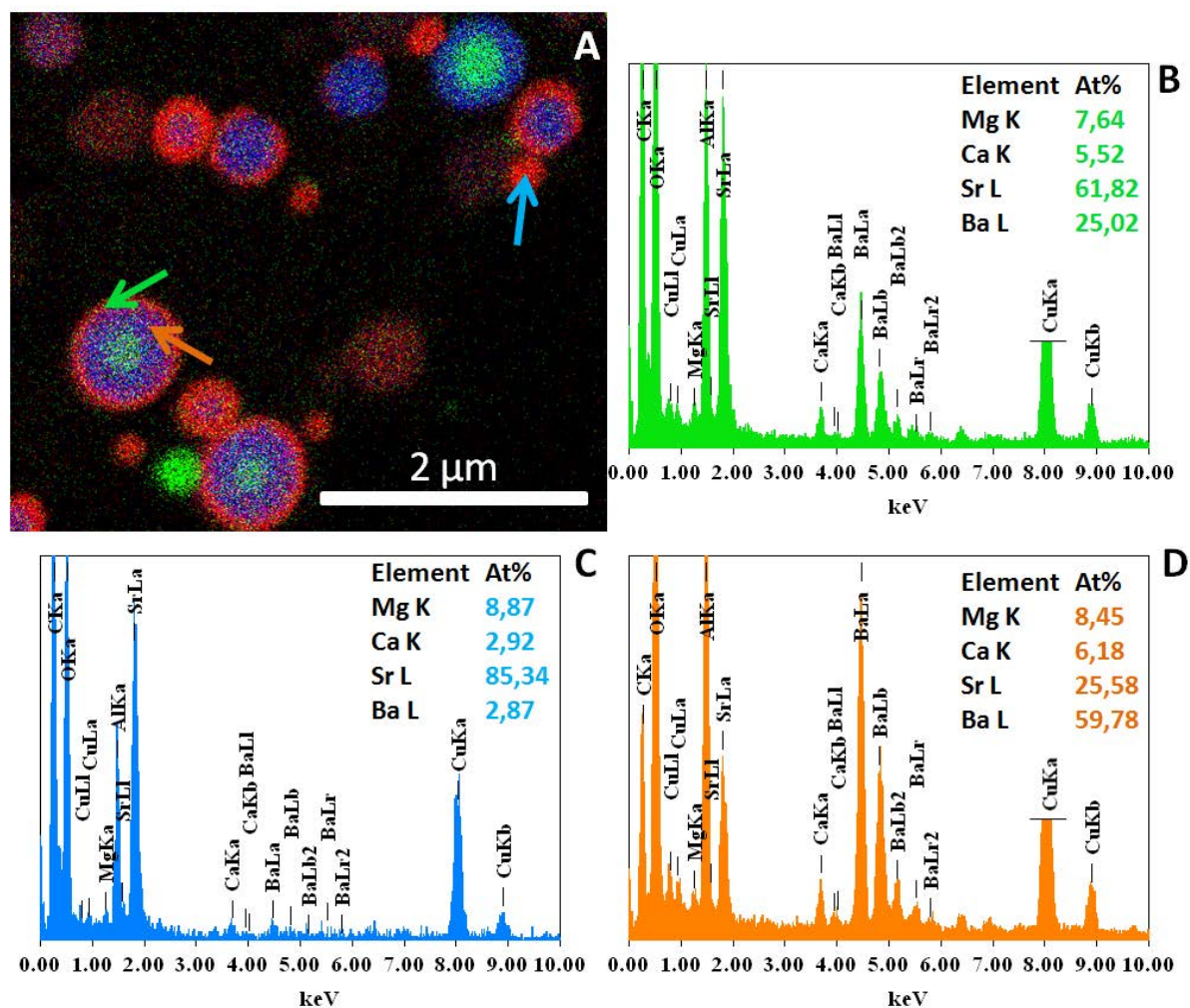


Figure 3.9 : Culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 µM de strontium et 50 µM de baryum, prélevée à t=244 h. (A) Cartographie EDXS du calcium (vert), strontium (rouge) et baryum (bleu) de plusieurs carbonates intracellulaires. (B) Spectre EDXS d'une couche externe riche en strontium d'une particule. (C) Spectre EDXS d'un carbonate riche en strontium. (D) Spectre EDXS d'une couche interne riche en baryum entre le cœur riche en calcium et la couche externe riche en strontium. De l'aluminium provenant du porte échantillon est visible sur les spectres.

La Figure 3.9 présente une cartographie du calcium, du strontium et du baryum des cellules d'une culture de *G. lithophora* C7 après 244 h d'incubation dans un milieu BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum. On peut voir que du carbonate de strontium s'est formé. Il y a des particules présentant un cœur de carbonate de calcium et deux couches différentes, une riche en baryum et, par-dessus, une couche riche en strontium (Figure 3.9-B, D). Ceci indique que du carbonate de strontium s'est formé sur les carbonates de baryum formés eux-mêmes auparavant sur des carbonates de calcium. On peut aussi voir de nouvelles inclusions contenant uniquement du strontium (Figure 3.9-C) : là encore il y a eu croissance de carbonates sur des particules préexistantes ainsi que nucléation de nouveaux germes de carbonates.

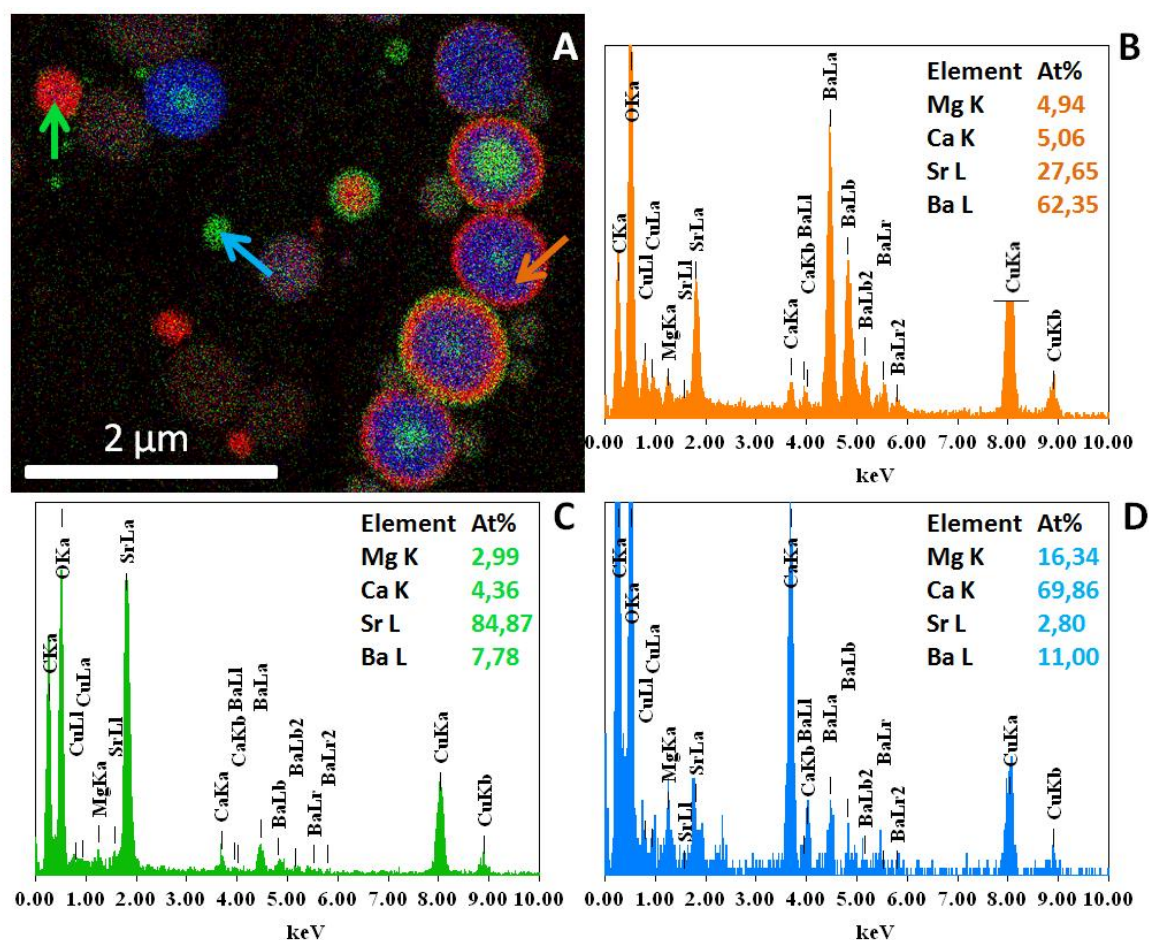


Figure 3.10 : Culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 50 μM de strontium et 50 μM de baryum, prélevée à $t = 310$ h. (A) Cartographie EDXS du calcium (vert), strontium (rouge) et baryum (bleu) de carbonates intracellulaires. (B) Spectres EDXS d'une couche riche en baryum entre un cœur riche en calcium et une couche externe riche en strontium. (C) Spectres EDXS d'une particule riche en strontium. (D) Spectres EDXS d'un carbonate riche en calcium.

La Figure 3.10 montre une cartographie du calcium, strontium et baryum dans des cellules d'une culture de *G. lithophora* C7 après 310 h d'incubation dans un milieu BG-11 contenant 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. À ce stade, tout le strontium et le baryum ont été incorporés et le calcium a diminué de 56 μM (23 %). On peut voir des inclusions formées d'un cœur riche en calcium, entouré successivement d'une couche riche en baryum (analysée dans la Figure 3.10-B), puis d'une couche riche en strontium et parfois d'une couche riche en calcium. D'autres combinaisons existent mais toujours dans le même ordre d'alternance. On peut remarquer que la particule de carbonate de calcium contient un peu de strontium et de baryum. Ce qui signifie qu'il y en avait toujours dans la cellule au moment de sa formation ou bien qu'il y a des couches externes peu épaisses (non visualisées clairement sur la photo). Ce qui signifierait que la partie riche en calcium s'est formée avant que les cellules soient incubées. On peut voir dans le coin supérieur gauche une inclusion formée d'un cœur de carbonate de

calcium et d'une couche de carbonate de baryum et à côté dans la même cellule une inclusion de carbonate de strontium pur. Au sein d'une même cellule on constate qu'il y a eu croissance de carbonate sur des carbonates préexistants et nucléation de nouveaux carbonates.

Si l'on résume les observations en microscopie électronique des cellules durant les trois différentes phases d'incorporation (baryum, strontium et calcium), nous avons mis en évidence une croissance couche par couche sur des carbonates préexistants, ainsi que la nucléation de nouvelles particules de carbonates pour chacun des éléments, suggérant des conditions de sursaturation intermédiaires telles qu'elles sont propices à la fois à la nucléation et à la croissance.

Dans le milieu BG-11, les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires contiennent également des inclusions riches en phosphore. Ces polyphosphates (déjà vu dans le chapitre 2) peuvent stocker des cations comme le calcium à des quantités très variables en fonction de la taille et du degré de polymérisation. Les compositions en cations sont normalisées par rapport au phosphore de l'inclusion. Des analyses EDXS faites en STEM montrent que ces polyphosphates peuvent également accumuler le strontium et le baryum. Pendant l'incorporation du baryum (à $t = 75$ h), le rapport Ba/P dans ces inclusions est de $0,29 \pm 0,11$ et le rapport Ca/P de $0,08 \pm 0,02^g$. Après l'incorporation du strontium (à $t = 310$ h), le rapport Ba/P ne varie pas ($0,23 \pm 0,08$) et le strontium est également présent dans les particules de phosphore ($Sr/P = 0,13 \pm 0,06$). La quantité de calcium présent dans les polyphosphates est aussi plus grande à $t = 310$ h ($Ca/P = 0,23 \pm 0,16$)^h comparé à $t = 75$ h ($Ca/P = 0,08 \pm 0,02$).

^g Mesure faite sur 29 inclusions

^h Mesure faite sur 26 inclusions

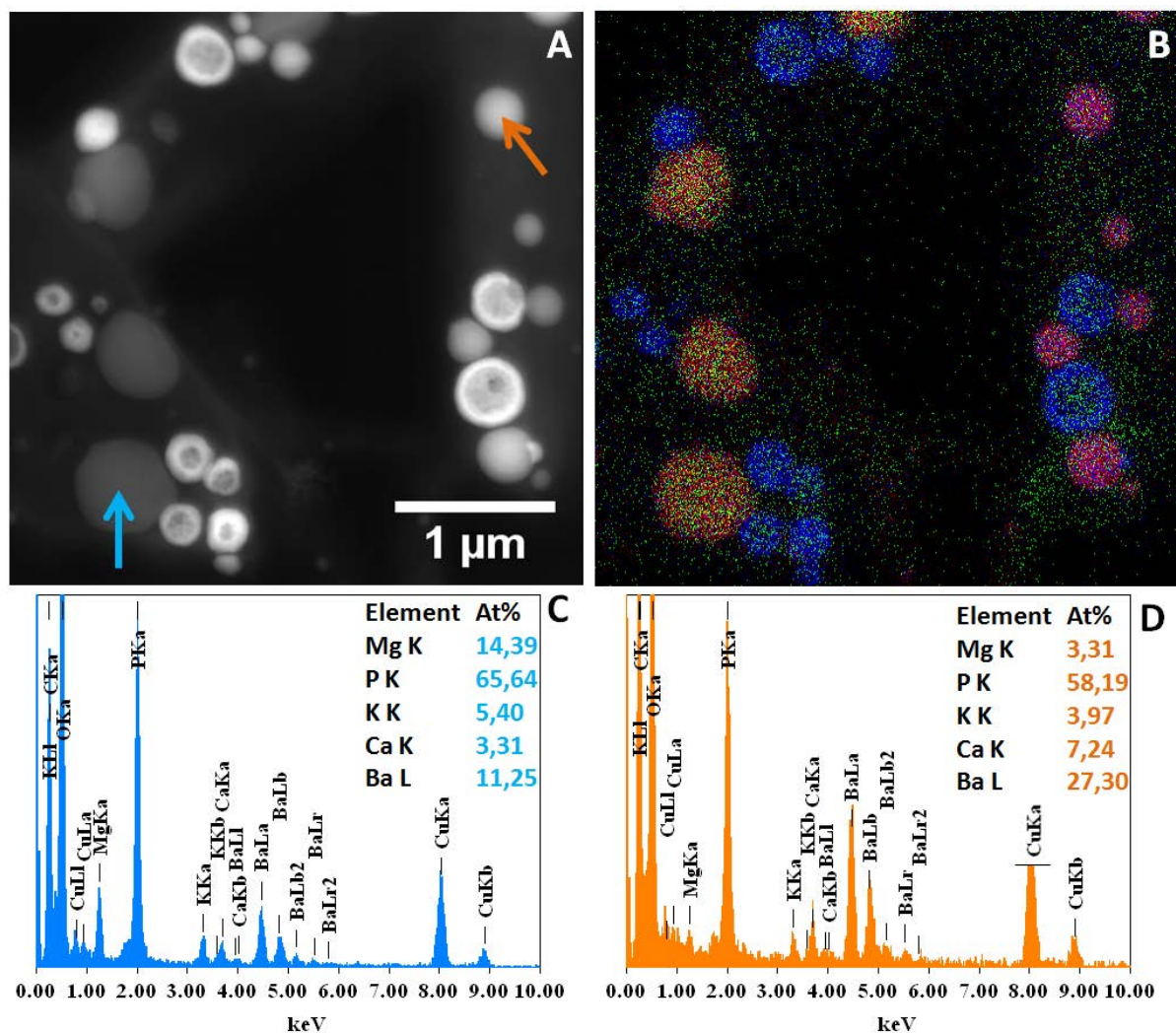


Figure 3.11 : Culture de *G.lithophora* C7 dans le milieu BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum, prélevée à t = 75 h. (A) Image en STEM HAADF de quelques cellules. (B) Cartographie EDXS du magnésium (vert), du phosphore (rouge) et du baryum (bleu). (C) Spectres EDXS d'un polyphosphate riche en magnésium. (D) Spectres EDXS d'un polyphosphate riche en calcium et en baryum.

Il existe cependant des variations de la composition chimique des polyphosphates entre les cellules. La Figure 3.11 montre une cartographie EDXS du phosphore, du baryum et du magnésium, sur deux cellules à t = 75 h. La concentration en baryum dans le milieu extracellulaire a commencé à diminuer et le strontium n'a pas encore été incorporé. On peut voir que dans l'une des deux cellules, les inclusions phosphatées contiennent plutôt du magnésium (spectre bleu) et dans l'autre cellule plutôt du baryum et du calcium (spectre orange). À côté, on peut voir des carbonates de calcium entourés de baryum dans les deux cellules. On peut remarquer que les rapports Ba/Ca dans ces deux types de polyphosphates sont similaires (~3,6).

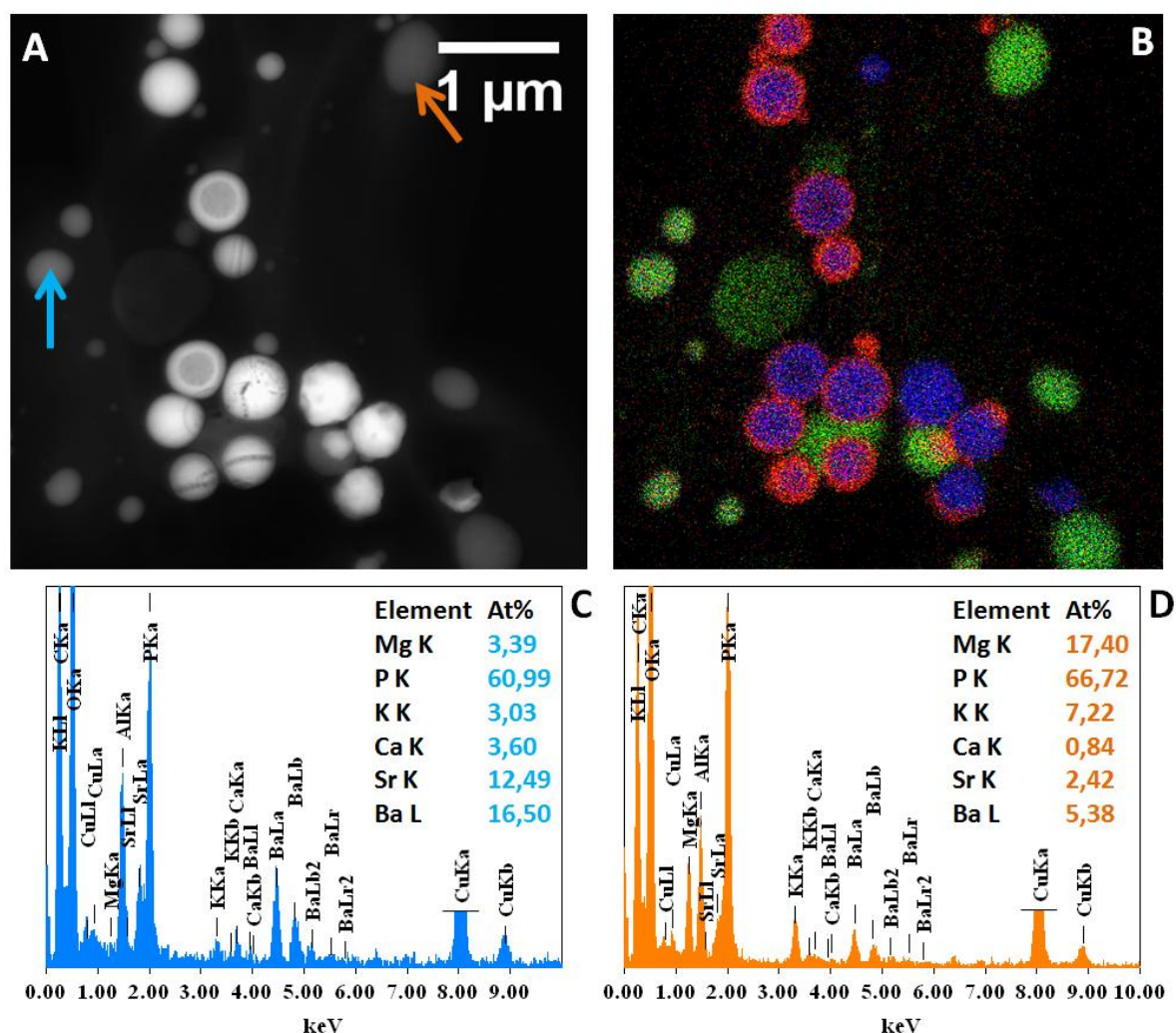


Figure 3.12 : Culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum, prélevée à t = 244 h. (A) Image en STEM HAADF de plusieurs cellules. (B) Cartographie EDXS du phosphore (vert), du strontium (rouge) et du baryum (bleu). (C) Spectres EDXS d'un polyphosphate riche en strontium et en baryum. (D) Spectres EDXS d'un polyphosphate riche en magnésium.

La Figure 3.12 présente une image de microscopie électronique des inclusions de *G. lithophora* C7 cultivée 244 heures dans un milieu BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum. Deux spectres EDXS de polyphosphates sont présentés. On peut voir que les polyphosphates ont également incorporé le strontium. Il y a aussi une hétérogénéité dans les compositions de ces inclusions : l'une est beaucoup plus riche en strontium et en baryum (spectre bleu). Les deux polyphosphates analysés sont dans deux cellules distinctes.

Les phases d'incorporation des cations se retrouvent plus ou moins dans les polyphosphates. Un enrichissement en baryum, puis en strontium, puis en calcium est visible mais il existe une grande variabilité de composition entre plusieurs cellules à un temps t.

2.1.2. Effet de concentrations plus élevées de strontium et de baryum : culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant 245 μM de strontium et de baryum sous lumière continue à 30 °C

Afin de mieux caractériser les différentes incorporations successives, une culture de *G. lithophora* C7 est incubée sous lumière continue, à 30 °C dans du milieu BG-11 avec 245 μM de strontium et 245 μM de baryum soit les mêmes concentrations que celle du calcium présente dans le BG-11. Le suivi de la culture de *G. lithophora* C7 est présenté en Figure 3.13. Comme pour les autres cultures de C7 dans du BG-11, le pH augmente doucement jusqu'à 7,9. Après 400 h d'incubation, celui-ci augmente plus rapidement et atteint 9,6 à $t = 530$ h. Une quarantaine d'heures après, le pH retombe à 8,4 et suit une augmentation plus lente. La DO à 730 nm augmente sans discontinuité et atteint 0,8 après 530 h d'incubation. Ce profil est le même pour les cultures de cette souche avec seulement 50 μM de strontium et de baryum (cf. 3, §2.1.1). Cette culture est la seule de C7 qui soit suivie après ce temps d'incubation. La DO est constante entre 530 et 400 h et augmente pour atteindre 1,5 unités après 670 h d'incubation dans le milieu.

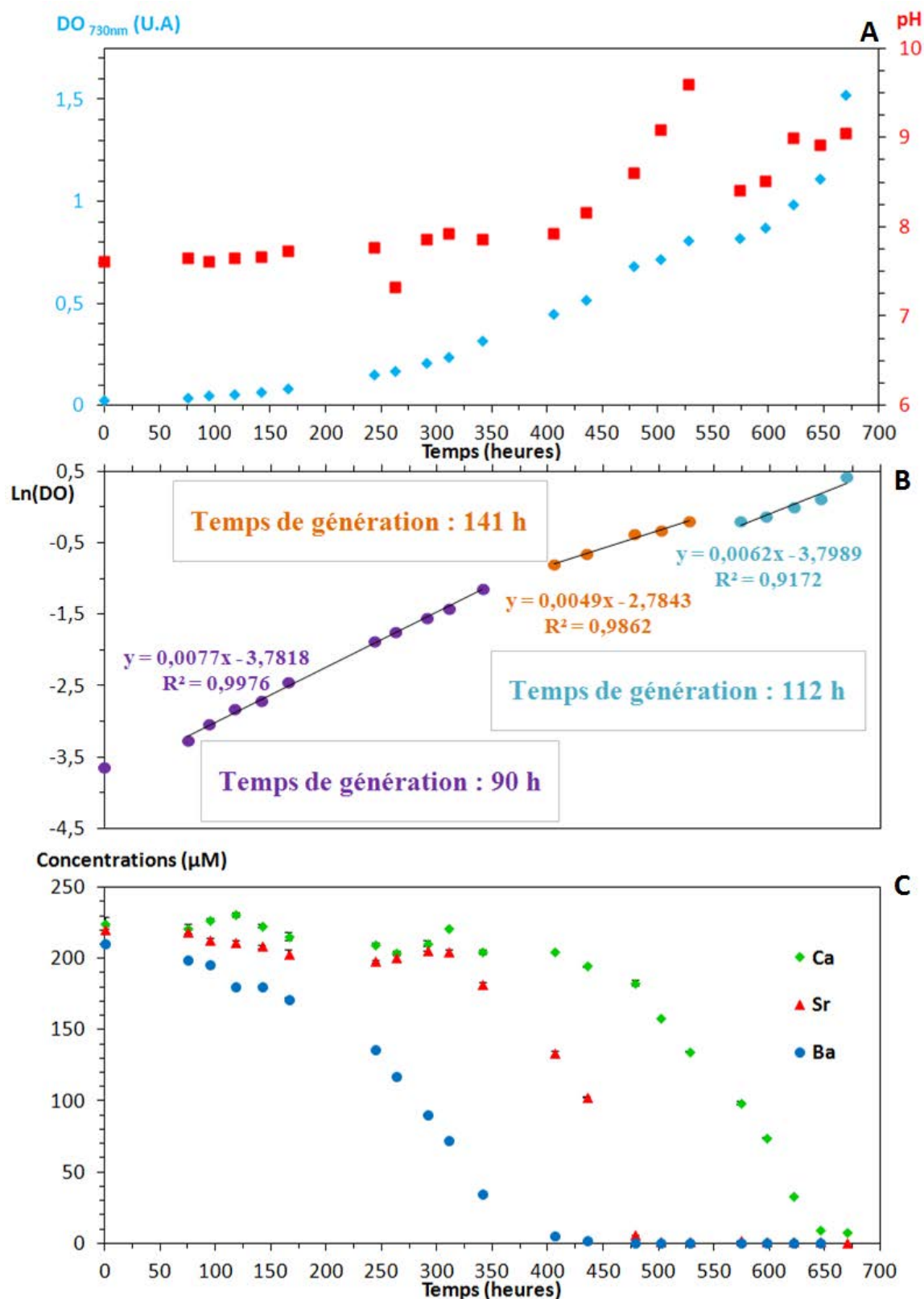


Figure 3.13 : Culture de *G. lithophora* C7 sous lumière continue, à 30 °C dans un milieu BG-11 avec 245 µM de strontium et 245 µM de baryum. (A) DO à 730 nm et pH du milieu en fonction du temps. (B) Logarithme népérien de la DO en fonction du temps. (C) Concentration en calcium, strontium et baryum dans le milieu extracellulaire.

Le graphique C montre, comme précédemment, la diminution successive de la concentration du baryum, puis du strontium et du calcium dans le milieu extracellulaire. Les concentrations initiales de calcium, strontium et baryum ne sont pas exactement de 245 μM : ceci est dû d'une part aux incertitudes lors de la préparation du milieu de culture utilisant des solutions mères concentrées et d'autre part à de possibles précipités notamment de baryte. Dans un milieu contenant les mêmes quantités de ces trois éléments, *G. lithophora* C7 incorpore encore préférentiellement le baryum par rapport au strontium et le strontium par rapport au calcium. À $t = 670$ h, la quantité de calcium a diminué de 96,4 %, le strontium de 99,9 % et le baryum de 100 %. La Figure 3.13-B permet de voir les changements du temps de génération de la culture. Au début, la culture croît avec un temps de génération de 90 h, ce qui est légèrement supérieur à celui des cultures incubées dans le BG-11 avec 50 μM de strontium et 50 μM de baryum qui est de 80 h. Le temps de génération augmente quand il n'y a plus de baryum dans la culture. Ensuite dans la phase de décroissance du calcium en solution, la DO stagne entre deux mesures. De façon concomitante le pH diminue de 1,2 unité. Cette latence incontrôlée est suivie d'un regain de croissance.

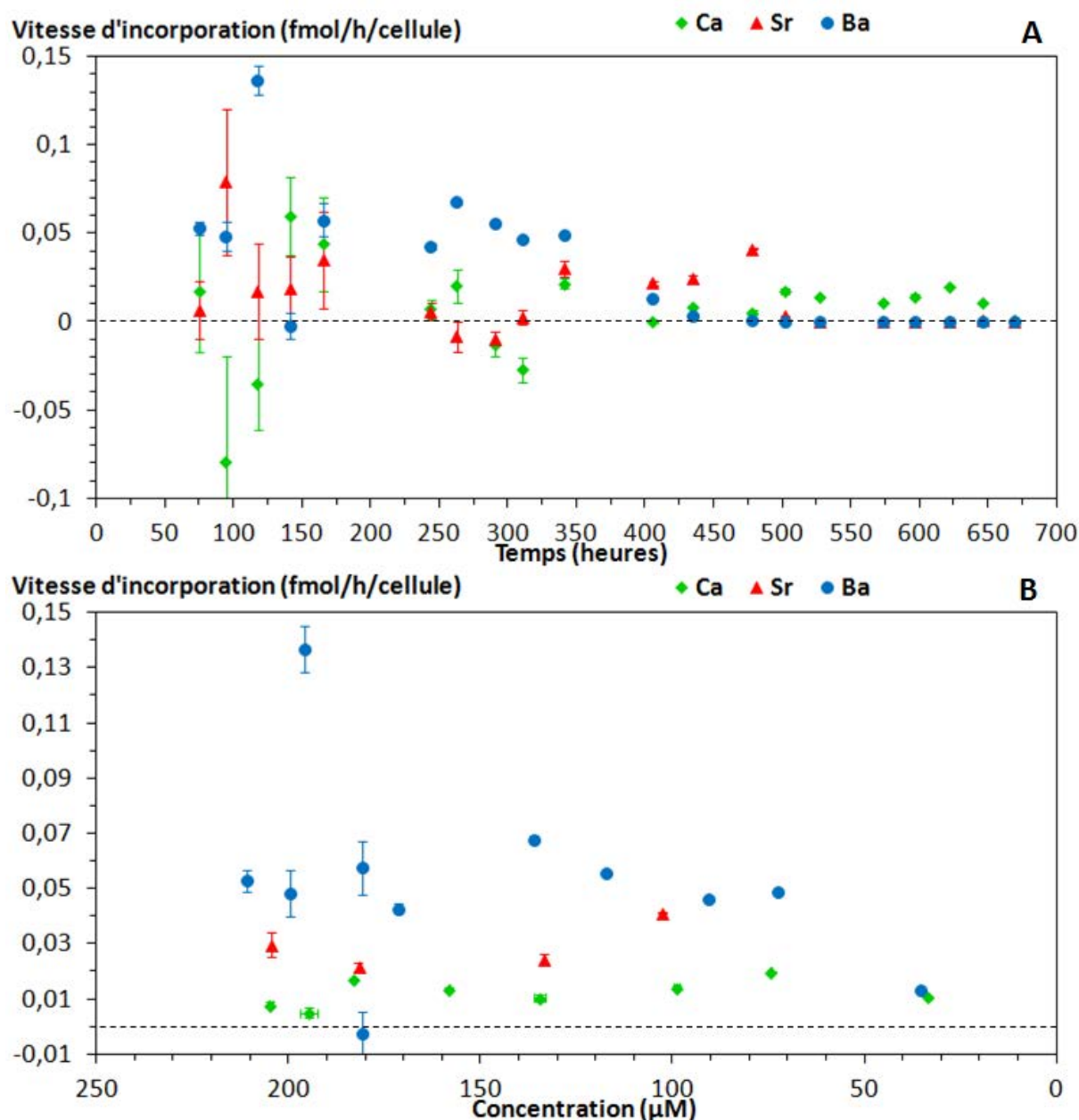


Figure 3.14 : Culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 avec 245 µM de strontium et 245 µM de baryum. Vitesses d'incorporation du calcium, strontium et baryum, (A) en fonction de l'âge de la culture et (B) en fonction de la concentration des éléments. Dans le graphique B, seules les valeurs correspondantes aux phases de décroissances sont prises en compte.

Les vitesses d'incorporation des différents cations (Figure 3.14) suivent la même diminution que dans les cultures contenant 50 µM de strontium et de baryum (Figure 3.4). Au début de la culture, le baryum est incorporé à une vitesse constante d'environ $0,057 \pm 0,031 \text{ fmol.h}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$, comme observé dans les cultures de la même souche dans un milieu BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum ($0,058 \pm 0,015$; cf. 2.1.1). Puis le strontium est incorporé à une vitesse de $0,029 \pm 0,009 \text{ fmol.h}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$ environ (contre $0,049 \pm 0,021$ dans §2.1.1) et enfin le

calcium à une vitesse de $0,012 \pm 0,005 \text{ fmol.h}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$ (contre $0,026 \pm 0,010$ en §2.1.1). Ces vitesses pour le strontium et le calcium sont inférieures à celles mesurées pour les cultures de la même souche dans un milieu BG-11 avec $50 \mu\text{M}$ de strontium et $50 \mu\text{M}$ de baryum.

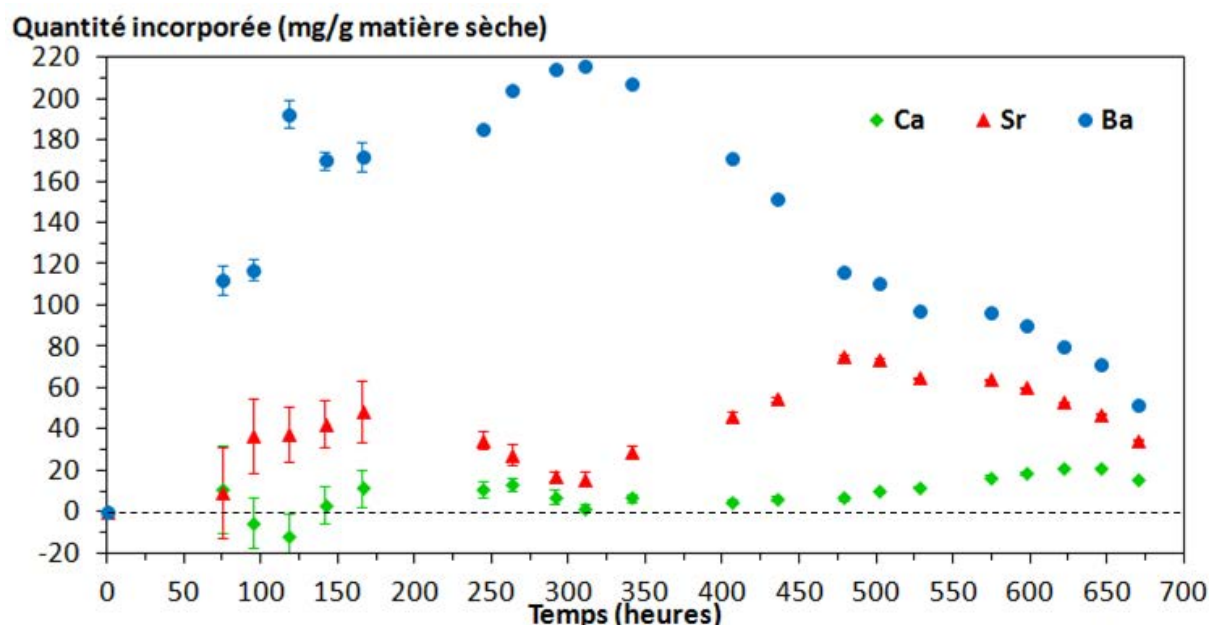


Figure 3.15: Culture de *G. lithophora* C7 sous lumière continue, à 30 °C dans un milieu BG-11 avec $245 \mu\text{M}$ de strontium et $245 \mu\text{M}$ de baryum. Quantités incorporées de calcium, strontium et baryum au cours du temps.

La Figure 3.15 montre les quantités de calcium, strontium et baryum incorporées par les cellules pendant la croissance de la culture. Cette souche cultivée dans le milieu BG-11 contenant $245 \mu\text{M}$ de strontium et $245 \mu\text{M}$ de baryum, montre des quantités de baryum et de strontium incorporées plus importantes que dans les cultures précédentes contenant $50 \mu\text{M}$ de baryum et de strontium (Figure 3.6). Les cellules de cette culture contiennent plus de 210 mg de baryum par g de matière sèche (21 %) à un moment de la culture. Une culture de cette souche est donc capable d'internaliser au moins $245 \mu\text{M}$ de baryum, $245 \mu\text{M}$ de strontium et $245 \mu\text{M}$ de calcium.

2.1.3. Effet de la température : culture de *G. lithophora* C7 dans le milieu BG-11 contenant du strontium et du baryum sous lumière continue à 25 °C

Une culture de *G. lithophora* C7 dans un milieu BG-11 avec $50 \mu\text{M}$ de strontium et $50 \mu\text{M}$ de baryum a été incubée sous lumière continue à une température légèrement plus basse que précédemment, à savoir 25 °C. En parallèle, une autre culture est inoculée avec la même pré-culture dans le même milieu mais à 30 °C. La DO, le pH ainsi que les concentrations en calcium, strontium et baryum dans le surnageant sont suivis au cours du temps dans les deux cultures.

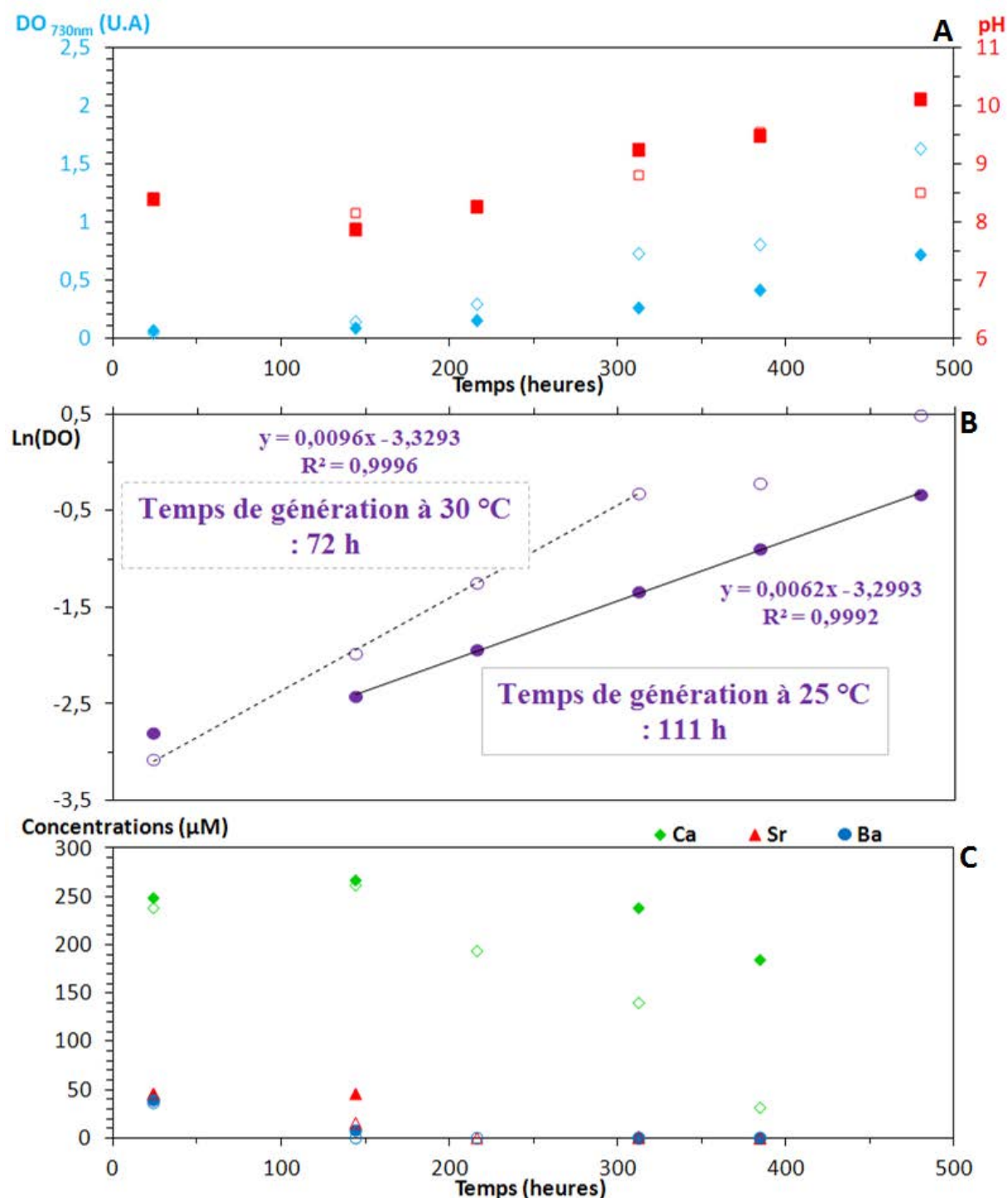


Figure 3.16 : Culture de *G. lithophora* C7 sous lumière continue dans un milieu BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum à 25 °C (signes pleins) et à 30 °C (signes vides). (A) DO et pH du milieu. (B) Logarithme népérien de la DO. (C) Concentration de calcium, strontium et baryum dans le milieu extracellulaire.

La Figure 3.16 montre les évolutions temporelles de la DO, du pH et des concentrations en calcium, strontium et baryum dans la culture à 25 °C comparées aux mêmes mesures faites sur la culture incubée à 30 °C. La croissance de la DO est plus lente à 25 °C qu'à 30 °C. Ceci ne vient pas que d'une différence de latence mais aussi

d'une différence de temps de génération. La culture incubée à 25 °C a un temps de génération de 111 h durant la phase de croissance exponentielle et la culture incubée à 30 °C, un temps de génération de 72 h.

L'optimum de température de la souche *G. lithophora* C7, découverte récemment, n'est pas connu. Ce que l'on peut dire c'est qu'il est plus proche de 30 °C que de 25 °C. À 25 °C, le strontium et le baryum sont incorporés dans le même ordre et dans leur totalité. On peut voir que contrairement à la culture à 30 °C, la concentration en strontium du milieu à 25 °C n'a pas commencé à diminuer à $t = 144$ h. Les différentes phases d'incorporation mises en évidence dans les cultures à 30 °C semblent donc plus lentes à 25 °C. Pour un même temps d'incubation, il y a plus de cellules dans la culture incubée à 30 °C. Les vitesses d'incorporation globales sont donc plus grandes que dans la culture à 25 °C.

2.1.4. Effet de l'absence de lumière : culture de *G. lithophora* C7 dans un milieu contenant du strontium et du baryum à l'obscurité

L'effet de l'absence de lumière sur l'incorporation du strontium et du baryum a été étudié. Deux cultures de *Gloeomargarita lithophora* C7 à 30 °C sous lumière continue sont séparées en deux à $t = 125$ h pour l'une et à $t = 310$ h pour l'autre. La moitié de chaque culture est placée à l'obscurité en la recouvrant de papier aluminium. L'autre moitié de chacune des deux cultures de départ sert de témoin et reste placée à la lumière (Figure 3.17).

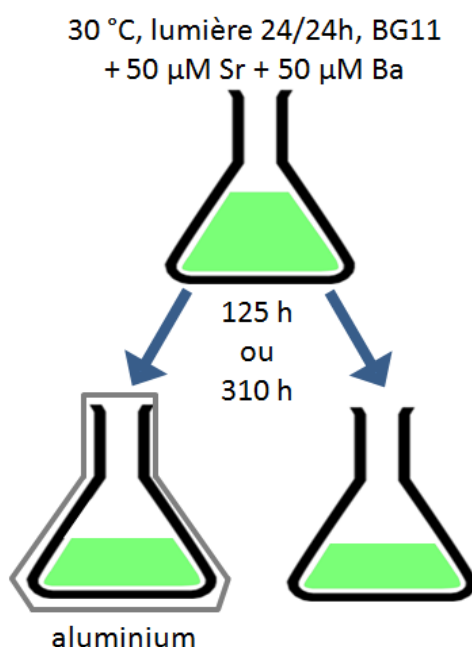


Figure 3.17 : Schéma du protocole effectué pour étudier l'effet de la lumière sur l'incorporation des différents éléments par la souche *G. lithophora* C7. Une culture est séparée en deux soit après 125 h, soit après 310 h d'incubation. Une moitié est mise à l'obscurité et l'autre moitié reste sous la lumière.

L'instant $t = 125$ h correspond à la phase d'incorporation du baryum. L'instant $t = 310$ h se situe après les phases d'incorporation du baryum et du strontium.

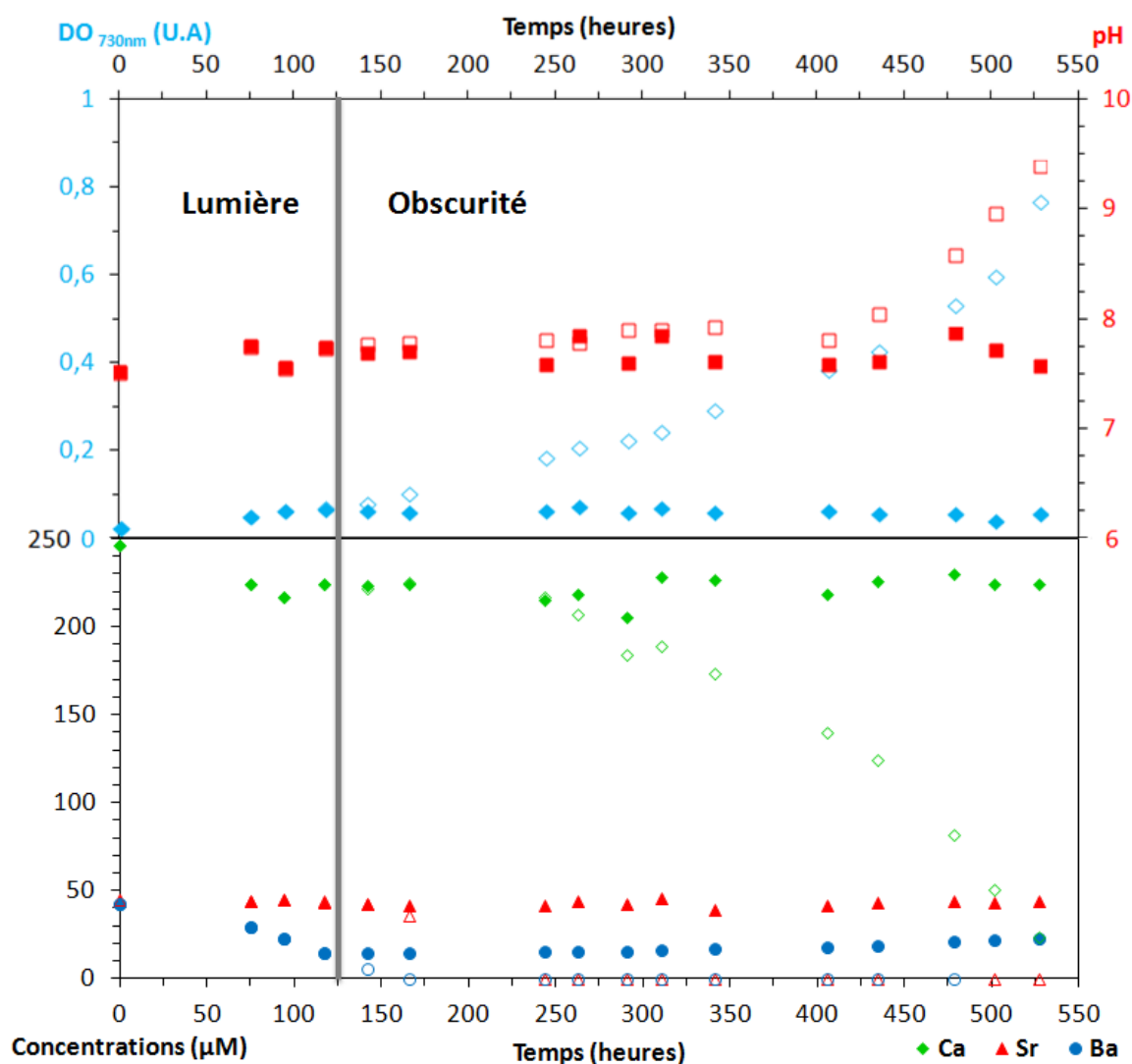


Figure 3.18 : Culture de *G. lithophora* C7 dans du BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum. Graphique supérieur : DO et pH du milieu. Graphique inférieur : concentrations extracellulaires en calcium, strontium et baryum. La culture est séparée en deux à $t = 125$ h, une moitié reste sous la lumière (signes vides) et l'autre moitié est placée à l'obscurité (signes pleins).

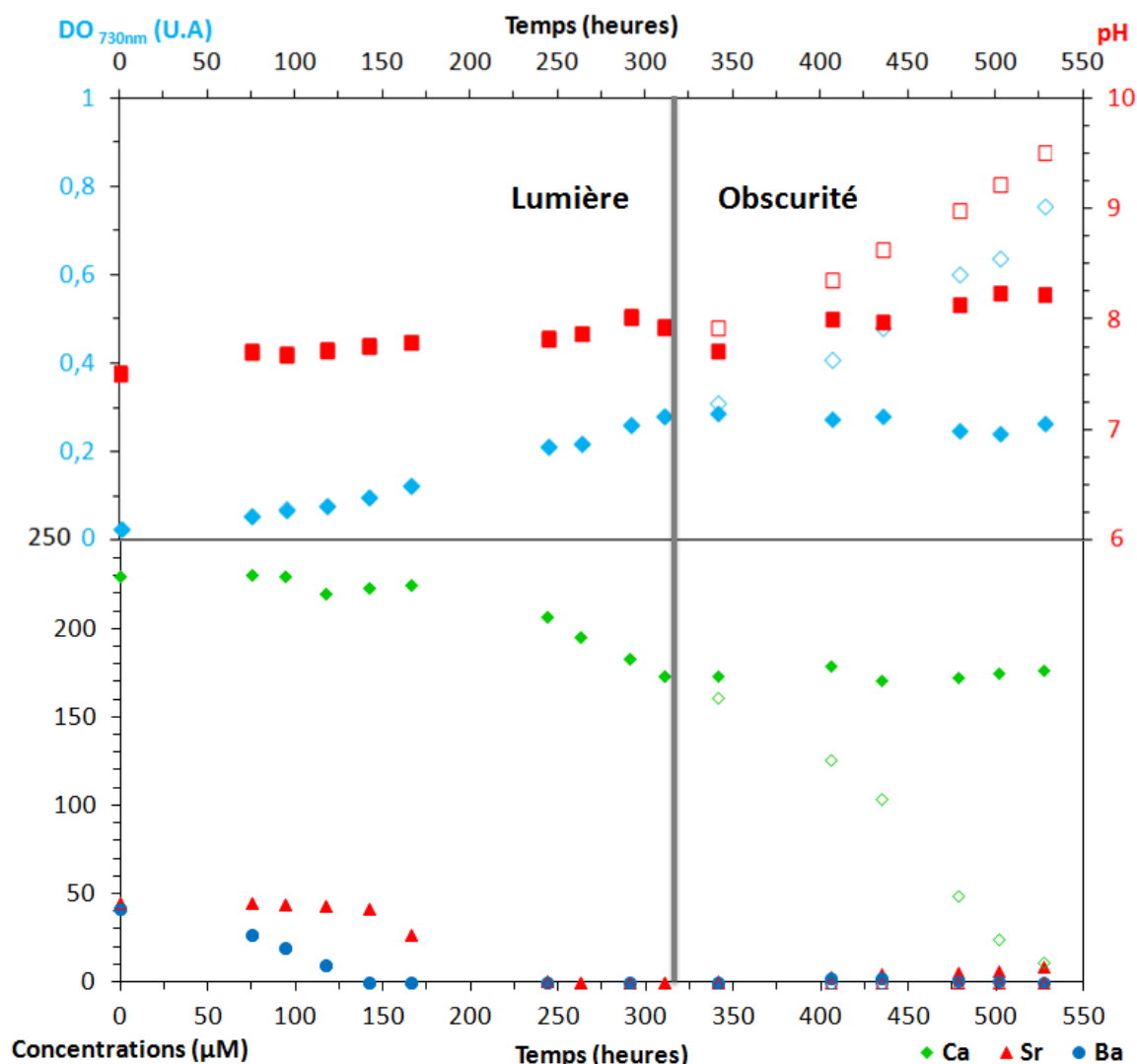


Figure 3.19 : Culture de *G. lithophora* C7 dans du BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum. Graphique supérieur : DO et pH du milieu. Graphique inférieur : concentrations extracellulaires en calcium, strontium et baryum. La culture est séparée en deux à $t = 310$ h, une moitié reste sous la lumière (signes vides) et l'autre moitié est placée à l'obscurité (signes pleins).

La Figure 3.18 et la Figure 3.19 présentent les suivis de DO, de pH et de concentrations en calcium, strontium et baryum dans le milieu de culture des cyanobactéries. Dans ces deux expériences, la DO et le pH stagnent à partir du moment où les cultures sont placées à l'obscurité. La culture ne croît plus dans ce milieu en absence de lumière. De plus, les concentrations en solution de calcium, strontium et baryum n'évoluent plus (au moins pendant 100 h) : l'incorporation est donc arrêtée et le baryum, strontium et calcium incorporés dans les cellules ne sont pas relargués dans le milieu extracellulaire lorsque les cellules sont placées à l'obscurité. Après 150 h sans lumière il semble que la concentration en strontium augmente légèrement jusqu'à au moins 25 µM.

Ces observations sont différentes de ce qui a été vu dans le chapitre 2, § 2.5.3 (p170). Une culture de la souche *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 y était en effet incubée dans du milieu BG-11 sous lumière continue à 45 °C puis, à un temps t , elle était placée à l'obscurité. La DO stagnait mais la concentration en calcium dans le milieu augmentait. Un relargage y était observé. Ici, le système semble plutôt figé. Cette différence vient peut être d'un comportement différent des deux souches de cyanobactéries en réponse à l'arrêt de l'éclairage.

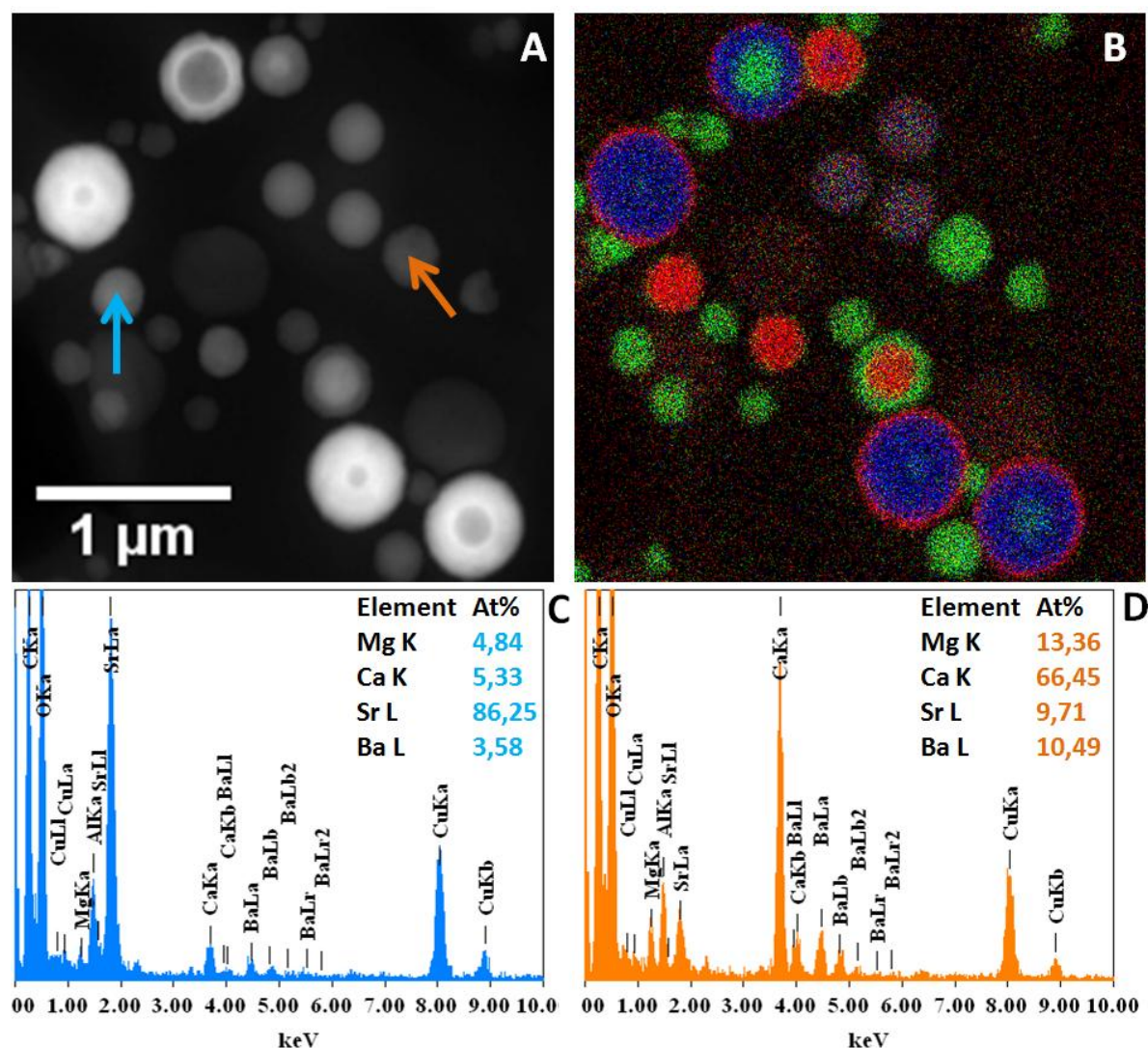


Figure 3.20 : Culture de *G. lithophora* C7 dans un milieu BG-11 avec 50 μM de strontium et 50 μM de baryum après 310 h de lumière, suivies de 200 h d'obscurité. (A) Images STEM en HAADF de plusieurs carbonates. (B) Cartographie EDXS du calcium (vert), du strontium (rouge) et du baryum (bleu). (C) Spectre EDXS correspondant à un carbonate riche en strontium (flèche bleue dans A). (D) Spectre EDXS d'un carbonate riche en calcium (flèche orange dans A).

La Figure 3.20 montre une image en STEM des carbonates intracellulaires de la culture de *G. lithophora* C7 éclairée pendant 310 h puis placée à l'obscurité pendant 200 h. Aucun test de viabilité n'a été fait mais en microscopie électronique, la morphologie de cette souche de cyanobactérie est conservée. Les différentes couches de carbonates sont visibles en STEM et en EDXS. Avant d'être mises à l'obscurité, les cyanobactéries ont incorporé successivement le baryum, le strontium et une partie du calcium (56 μM). Avant de ne plus être éclairée, les cyanobactéries contiennent donc des carbonates de calcium, de baryum et de strontium comme vu précédemment. Les couches les plus récentes sont des carbonates de calcium. Sur les images de STEM montrant cette culture après 200 h d'obscurité, on peut voir des carbonates de calcium et un carbonate ayant un cœur riche en strontium et une couche riche en calcium. Ces observations confirment que les carbonates formés ne sont pas dissous de manière importante même après une longue période sans lumière.

2.2. Incorporation du strontium et du baryum par la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425

PCC 7425 est une souche de cyanobactérie relativement éloignée phylogénétiquement de *G. lithophora* C7 et elle forme des carbonates intracellulaires dispersés dans le cytoplasme comme C7.

Une culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425 est incubée à 30 °C sous lumière continue avec un milieu BG-11 contenant 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. La DO, le pH ainsi que les concentrations en solution de calcium, strontium et baryum sont suivis au cours du temps (Figure 3.21). On peut voir que la croissance est similaire à celle de la culture de la même souche dans un milieu BG-11 sans strontium ni baryum vue dans le chapitre 2 (§ 2.2.1). Le temps de génération est de 58 h et augmente jusqu'à 189 h pour $t = 275$ h.

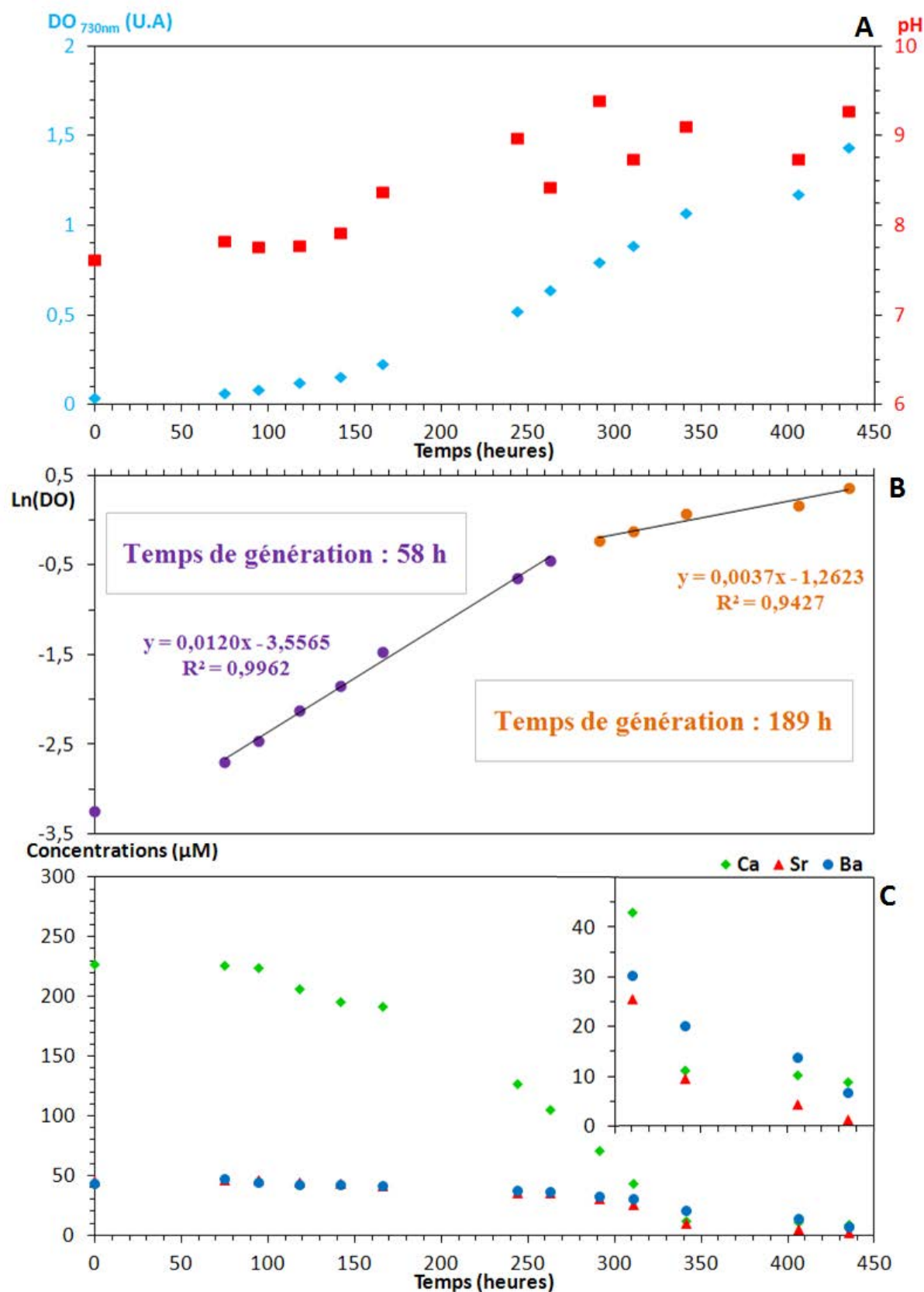


Figure 3.21 : Culture de *Cyanosche* sp. PCC 7425 sous lumière continue, à 30 °C dans le milieu BG-11 avec 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. (A) DO et pH du milieu. (B) Logarithme népérien de la DO. (C) Concentration de calcium, strontium et baryum en solution. L'insert (graphique C) présente les concentrations entre 300 et 450 h.

Le suivi des concentrations en solution de calcium, strontium et baryum dans la culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 3.21-C) montre un comportement très différent de celui de *Gloeomargarita lithophora* C7 (Figure 3.2). Le calcium diminue en premier ; puis le strontium et le baryum sont incorporés à partir de l'instant où le calcium est dans des concentrations voisines de celles du strontium et du baryum. De plus, le strontium semble être pris de façon préférentielle au baryum. Le strontium et le baryum commencent à être incorporés vers $t = 275$ h, à la fin de la première phase de croissance exponentielle de la culture. À $t = 435$ h, la quantité de calcium a diminué de 96,1 %, celle de strontium de 96,9 % et celle de baryum de 84,1 %.

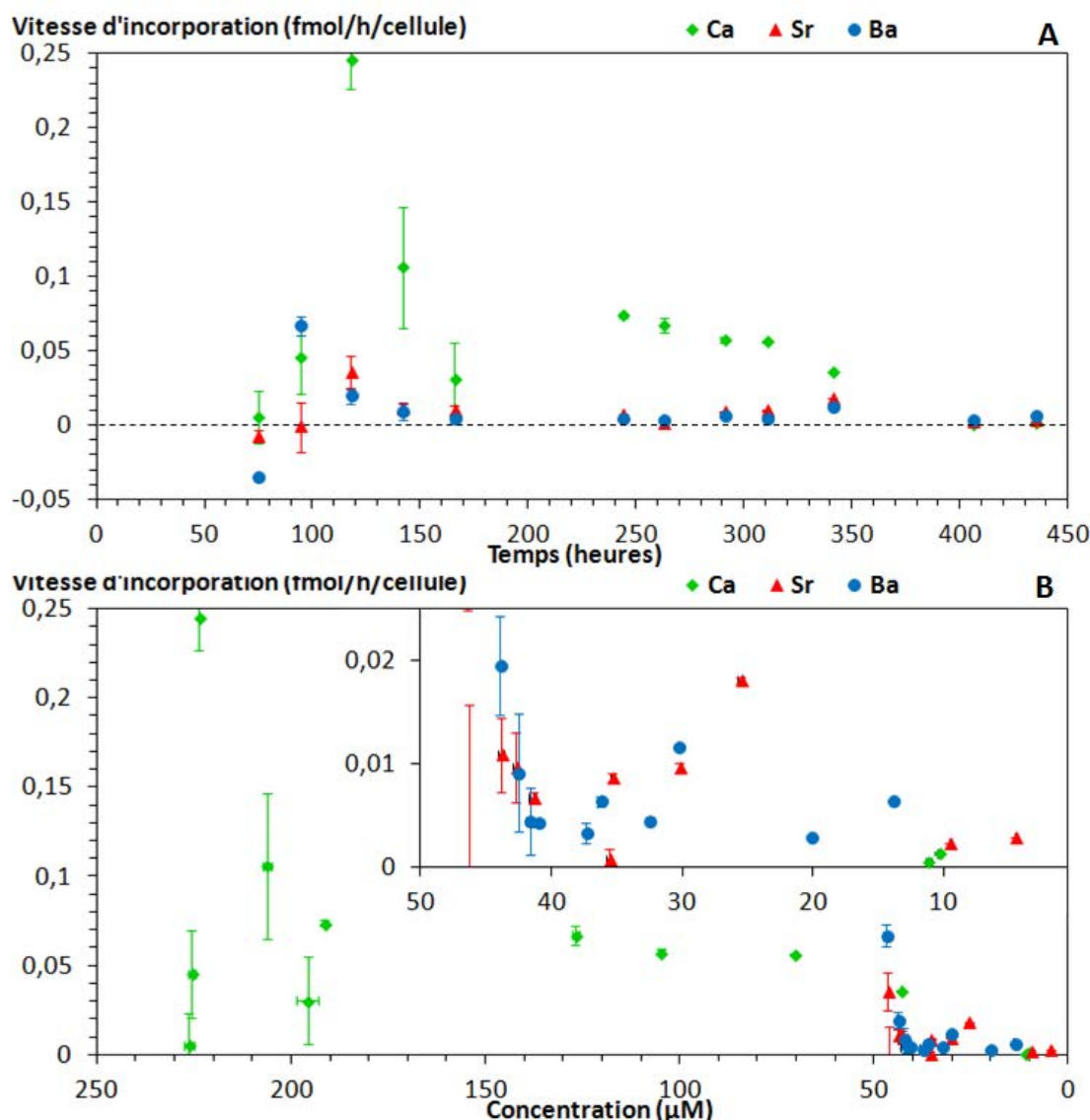


Figure 3.22 : Culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425 sous lumière continue, à 30 °C dans un milieu BG-11 avec 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. Vitesses d'incorporation du calcium, strontium et baryum, (A) en fonction de l'âge de la culture et (B) en fonction de leur concentration. Dans le graphique B seules les vitesses pendant les phases d'incorporation sont prises en compte. L'insert présente les valeurs entre 0 et 50 μM.

La Figure 3.22 présente la vitesse d'incorporation de chaque élément (calcium, strontium et baryum). La vitesse d'incorporation du calcium est relativement constante autour de $0,085 \pm 0,068 \text{ fmol.h}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$ sur une large gamme de concentration (50-250 μM). Cette vitesse est similaire à celles mesurées dans un milieu BG-11 sans strontium ni baryum ($0,081 \pm 0,061 \text{ fmol.h}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$ sur une gamme de 50 à 200 μM) (cf. Chapitre 2, § 2.2.1). Le strontium et le baryum sont incorporés à des taux de $0,0069 \pm 0,0059 \text{ fmol.h}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$ pour le strontium et de $0,0056 \pm 0,0030$ pour le baryum soit environ 10 fois moins vite que *G. lithophora* C7 dans les mêmes conditions (cf. 3, § 2.1.1).

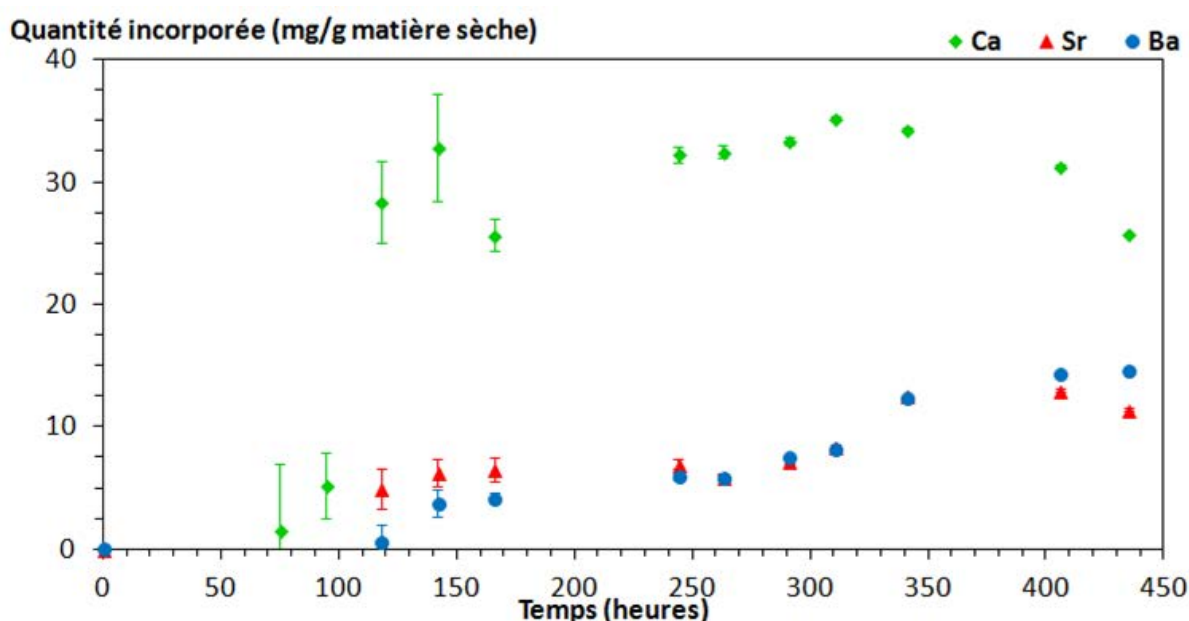


Figure 3.23 : Culture de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 sous lumière continue, à 30 °C dans un milieu BG-11 avec 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. Quantités incorporées dans la culture au cours du temps.

La Figure 3.23 présente les quantités massiques de calcium, strontium et baryum incorporées dans les cellules de la souche PCC 7425. Il a été vu que la souche *G. lithophora* C7 incorpore dans les mêmes conditions au maximum 180, 60 et 40 mg/g de baryum, strontium et calcium respectivement. Ces maximas étaient atteints à différents instants. PCC 7425 incorpore des taux de baryum, strontium et calcium moins élevés (12 mg/g pour le strontium et le baryum et 32 mg/g pour le calcium) avec un maximum quasi-concomitant pour les trois éléments vers 350-450 h.

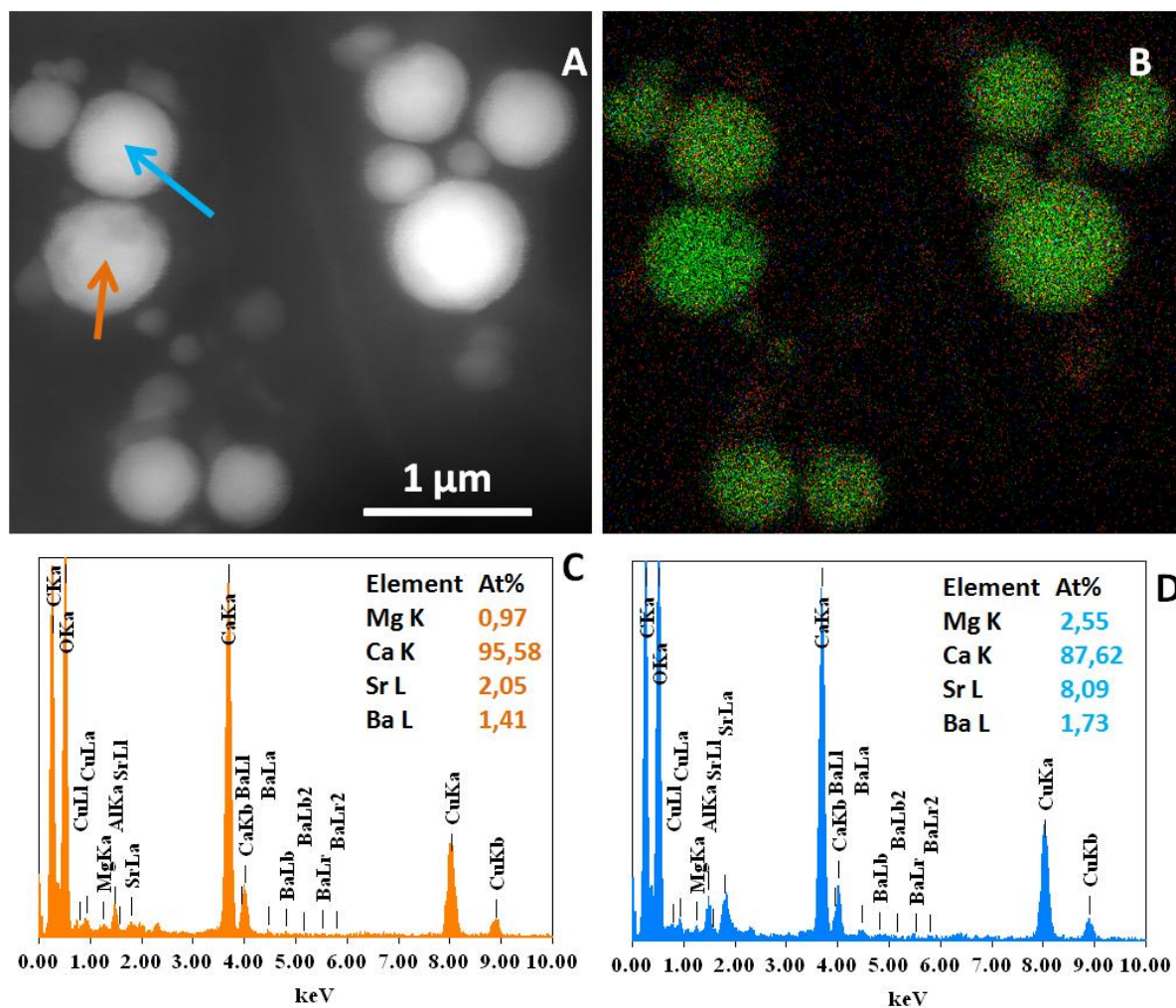


Figure 3.24 : Culture de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 sous lumière continue, à 30 °C dans le milieu BG-11 avec 50 μ M de strontium et 50 μ M de baryum prélevée à $t = 244$ h. (A) Image STEM en HAADF de deux cellules. (B) Cartographie EDXS correspondante du calcium (vert), du strontium (rouge) et du baryum (bleu). (C) Spectre EDXS d'un carbonate (flèche orange dans A). (D) Spectre EDXS d'un autre carbonate de la même cellule (flèche bleue dans A), ce carbonate est plus riche de strontium.

Après 244 h dans un milieu contenant du strontium et du baryum (Figure 3.24), on peut voir dans une cellule des inclusions de carbonate de calcium contenant du strontium et du baryum. Les différentes inclusions observées dans la même cellule ont des rapports Sr/Ca différents.

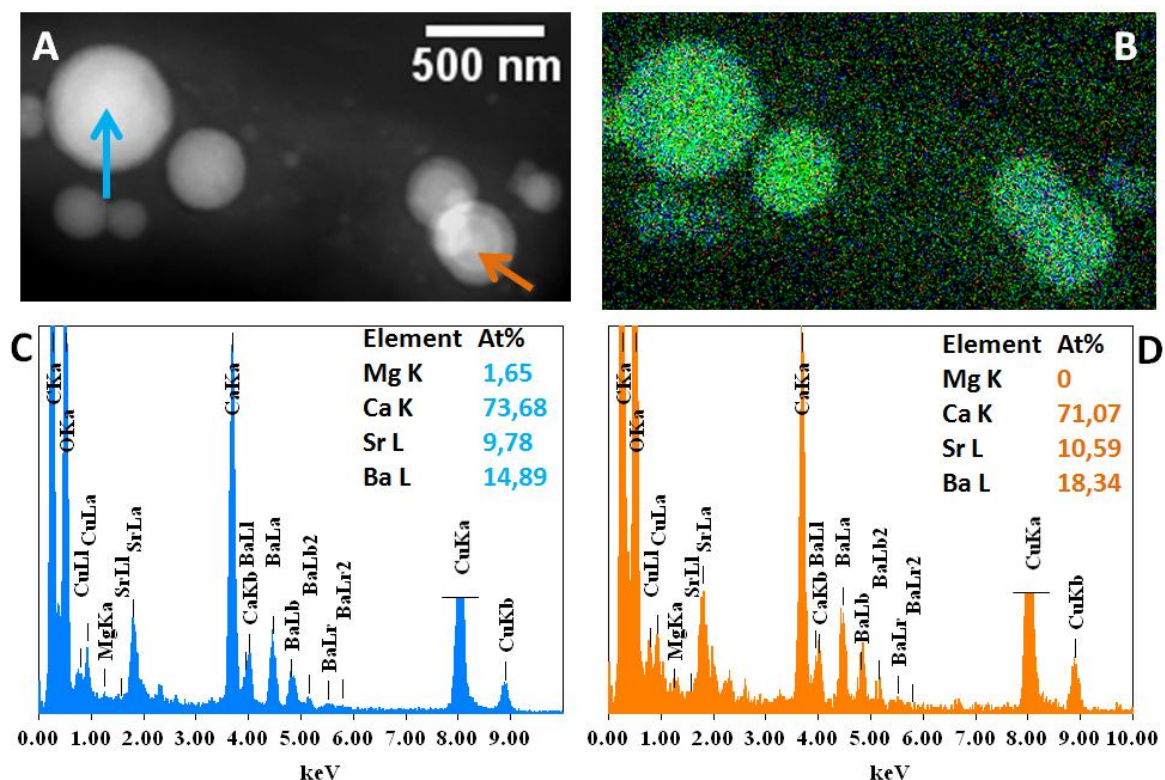


Figure 3.25 : Culture de *Cyanoschece* sp. PCC 7425 sous lumière continue, à 30 °C dans le milieu BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum, prélevée à $t = 310$ h. (A) Image STEM en HAADF d'une cellule. (B) Cartographie EDXS du calcium (vert), du strontium (rouge) et du baryum (bleu). (C) Spectre EDXS d'un carbonate de la cellule. (D) Spectre EDXS d'un autre carbonate.

La Figure 3.25 et la Figure 3.26 montrent des images de microscopie électronique de la culture de *Cyanoschece* sp. PCC 7425 à $t = 310$ h dans un milieu BG-11 avec du strontium et du baryum. Le mode HAADF, semble montrer des anneaux dans certains carbonates (Figure 3.25). En revanche, l'analyse EDXS ne montre pas de ségrégation spatiale dans la composition d'une inclusion de carbonate. Par contre, on peut se rendre compte que les rapports Sr/Ca et Ba/Ca sont supérieurs à ceux observés à $t = 244$ h. Ces rapports passent de 0,08 à 0,15 pour le rapport Sr/Ca et de 0,03 à 0,26 pour Ba/Ca.

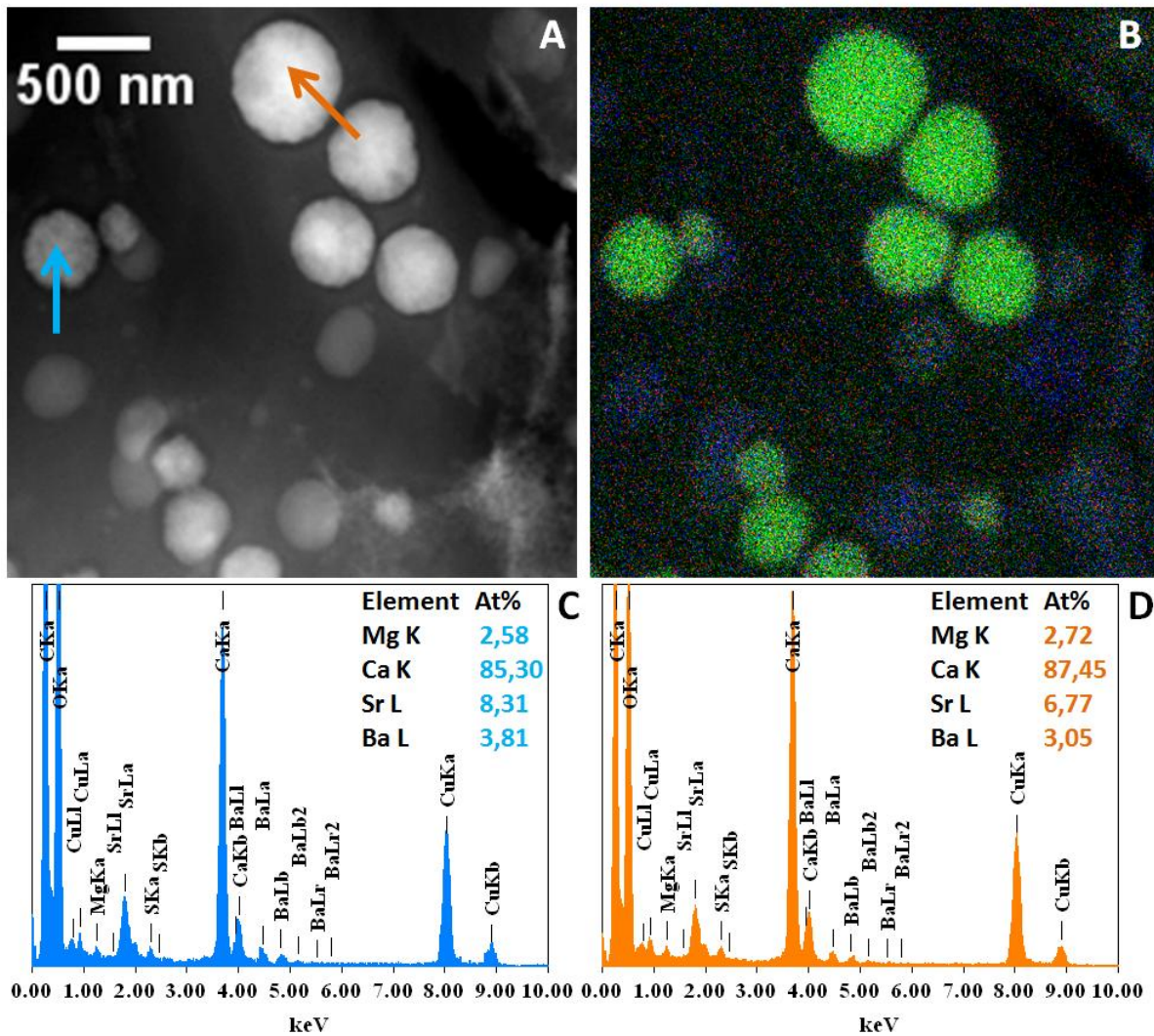


Figure 3.26 : Culture de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 sous lumière continue, à 30 °C dans le milieu BG-11 avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum prélevée à t = 310 h. (A) Image STEM en HAADF e plusieurs carbonates. (B) Cartographie EDXS correspondante du calcium (vert), du strontium (rouge) et du baryum (bleu). (C) Spectre EDXS d'un carbonate. (D) Spectre EDXS d'un carbonate d'une autre cellule.

2.3. Incorporation du strontium et du baryum par les souches

Synechococcus calcipolaris G9 et *Synechococcus* sp. PCC 6312

Ces deux souches appartiennent à un même clade phylogénétique regroupant aussi *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, une souche thermophile. Elles font des carbonates au niveau de leur septum de division et par conséquent les inclusions se retrouvent principalement aux pôles des cellules (Benzerara et al., 2014).

Les souches *Synechococcus calcipolaris* G9 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 ont été incubées à 30 °C sous 18h/24 de lumière pour G9 et sous lumière continue pour PCC 6312 dans un milieu BG-11 avec du strontium (50 µM) et du baryum (50 µM).

La Figure 3.27 présente le suivi de la culture de *S. calcipolaris* G9. Sur la durée suivie, les concentrations en solution de strontium et de baryum ne varient pas. La concentration en calcium commence à diminuer avant 380 h. Cette souche présente le même comportement que la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425 en ne prenant que le calcium au début dans ces conditions.

La Figure 3.28 montre les vitesses d'incorporation et les quantités de calcium, strontium et baryum prises par les cellules. Durant le début de la phase d'incorporation du calcium ($t = 380$ h), la vitesse est de $0,048 \text{ fmol.h}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$. La souche *Synechococcus calcipolaris* G9 cultivée dans du BG-11 avec $50 \text{ }\mu\text{M}$ de strontium et $50 \text{ }\mu\text{M}$ de baryum incorpore préférentiellement le calcium. Néanmoins du baryum et du strontium sont incorporés dans les cellules (3,7 mg de strontium par g de matière sèche et 3,3 mg/g de baryum après 380 h d'incubation)

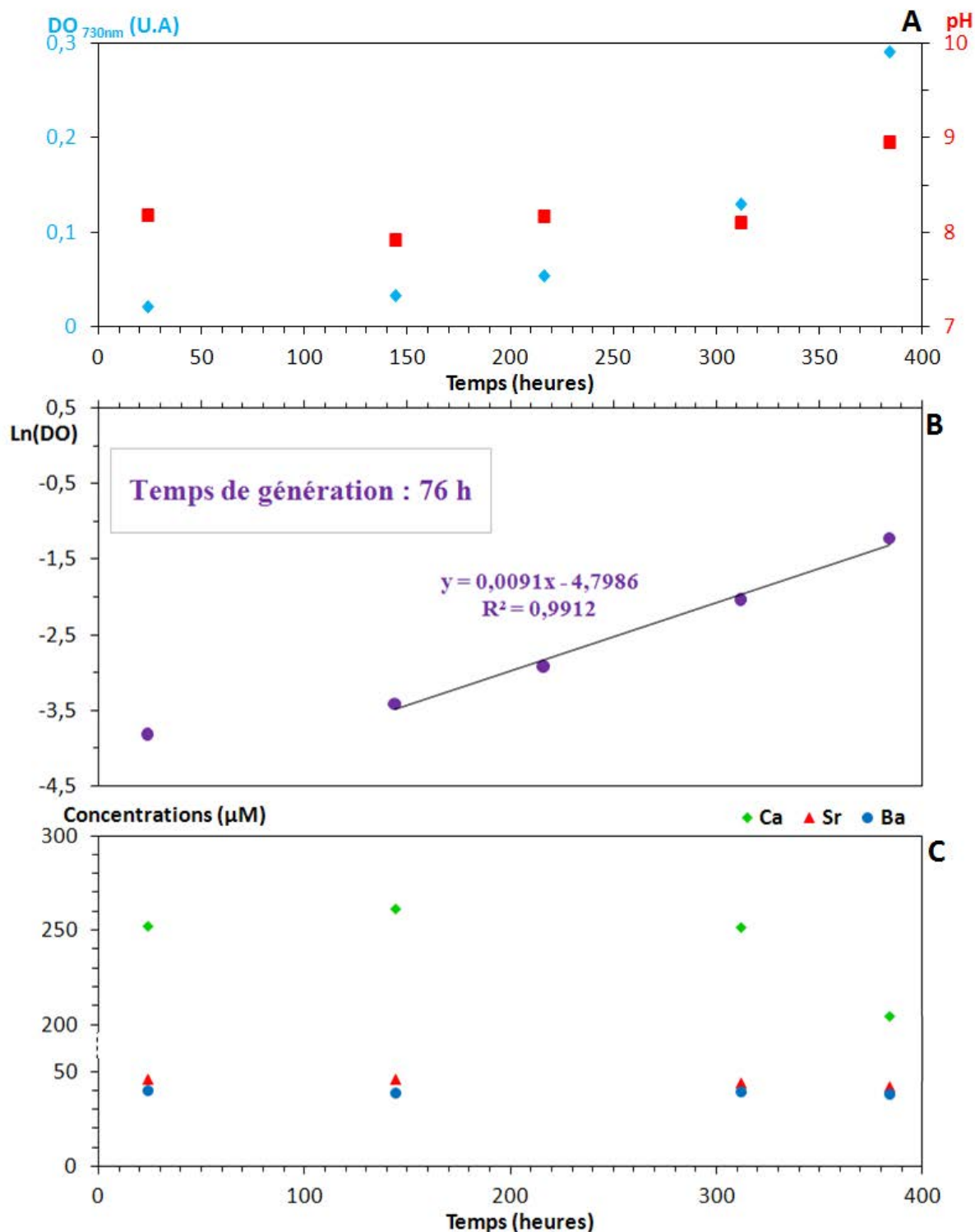


Figure 3.27 : Culture de *Synechococcus calcipolaris* G9 sous 18 h de lumière par jour, à 22 °C dans le milieu BG-11 avec 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. (A) DO et pH du milieu. (B) Logarithme népérien de la DO. (C) Concentration de calcium, strontium et baryum dans le milieu extracellulaire.

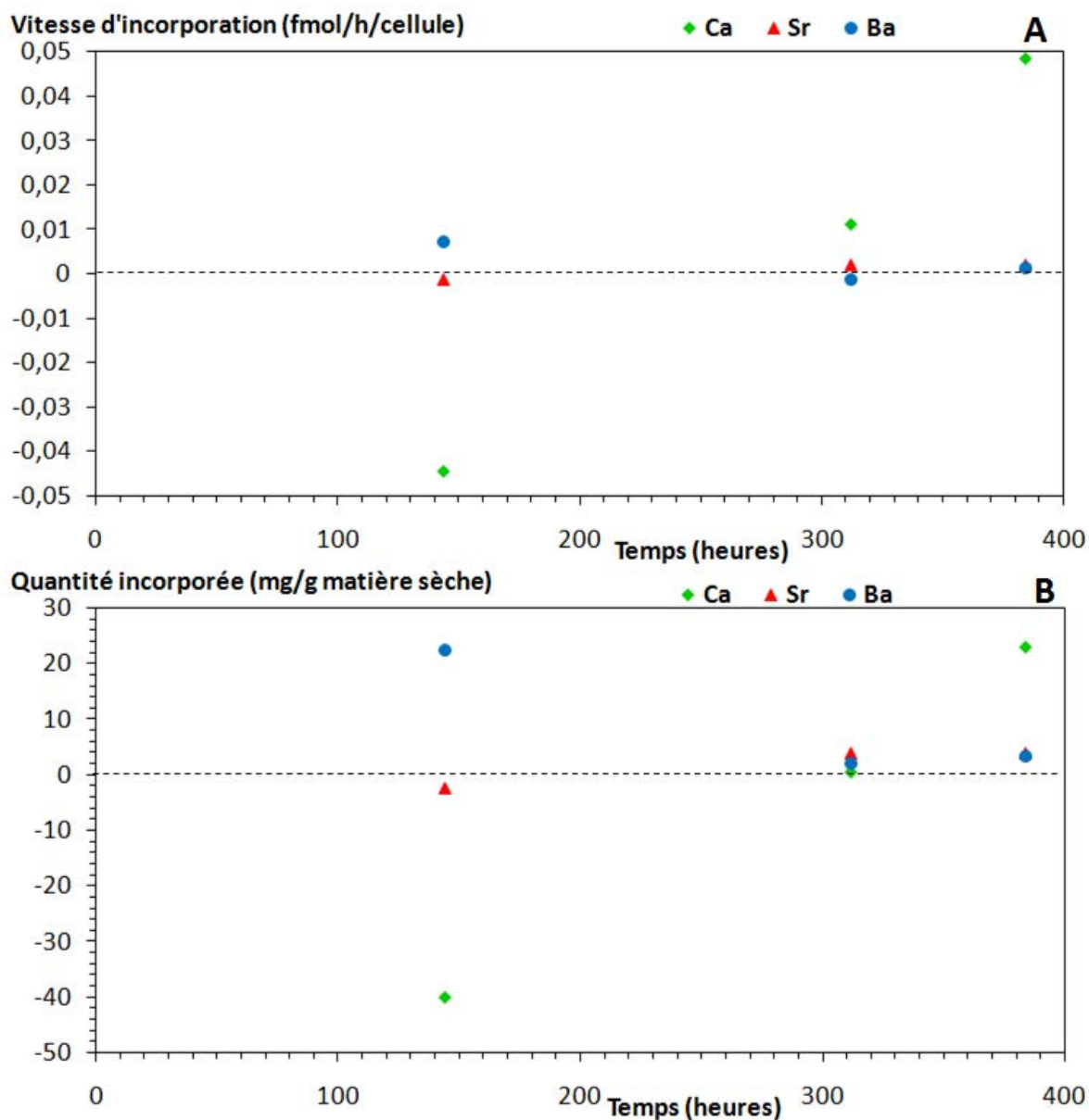


Figure 3.28 : Culture de *Synechococcus calcipolaris* G9 sous 18 h de lumière par jour, à 22 °C dans le milieu BG-11 avec 50 μ M de strontium et 50 μ M de baryum. (A) Vitesses d'incorporation du calcium, strontium et baryum. (B) Quantités incorporées.

Une culture de *Synechococcus* sp. PCC 6312 est incubée dans un milieu BG-11 avec 50 μ M de strontium et 50 μ M de baryum sous lumière continue, le suivi est présenté en Figure 3.29.

La culture croît de la même façon que dans un milieu BG-11 sans strontium ni baryum (cf. annexe 2). On peut voir la concentration en calcium diminuer pendant que les concentrations en strontium et baryum varient peu (elles semblent diminuer au début puis stagner). Cette souche a le même comportement que *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus calcipolaris* G9 dans ce milieu. Le calcium est incorporé préférentiellement au strontium et au baryum.

La Figure 3.30 montre les vitesses d'incorporation des différents éléments ainsi que les quantités incorporées au cours du temps. On peut voir que la vitesse d'incorporation du calcium décroît avec l'âge de la culture et avec la diminution de la concentration en calcium extracellulaire. Le même phénomène est observé dans un milieu sans strontium ni baryum (cf. Chapitre 2). Cette souche incorpore préférentiellement le calcium mais du strontium et du baryum sont incorporés également. Environ 3,3 mg de strontium par g de matière sèche sont présents dans les cellules à partir de 150 h d'incubation. La quantité de baryum est de 12 mg/g à 150 h, cette quantité diminue jusqu'à 3,2 à 380 h.

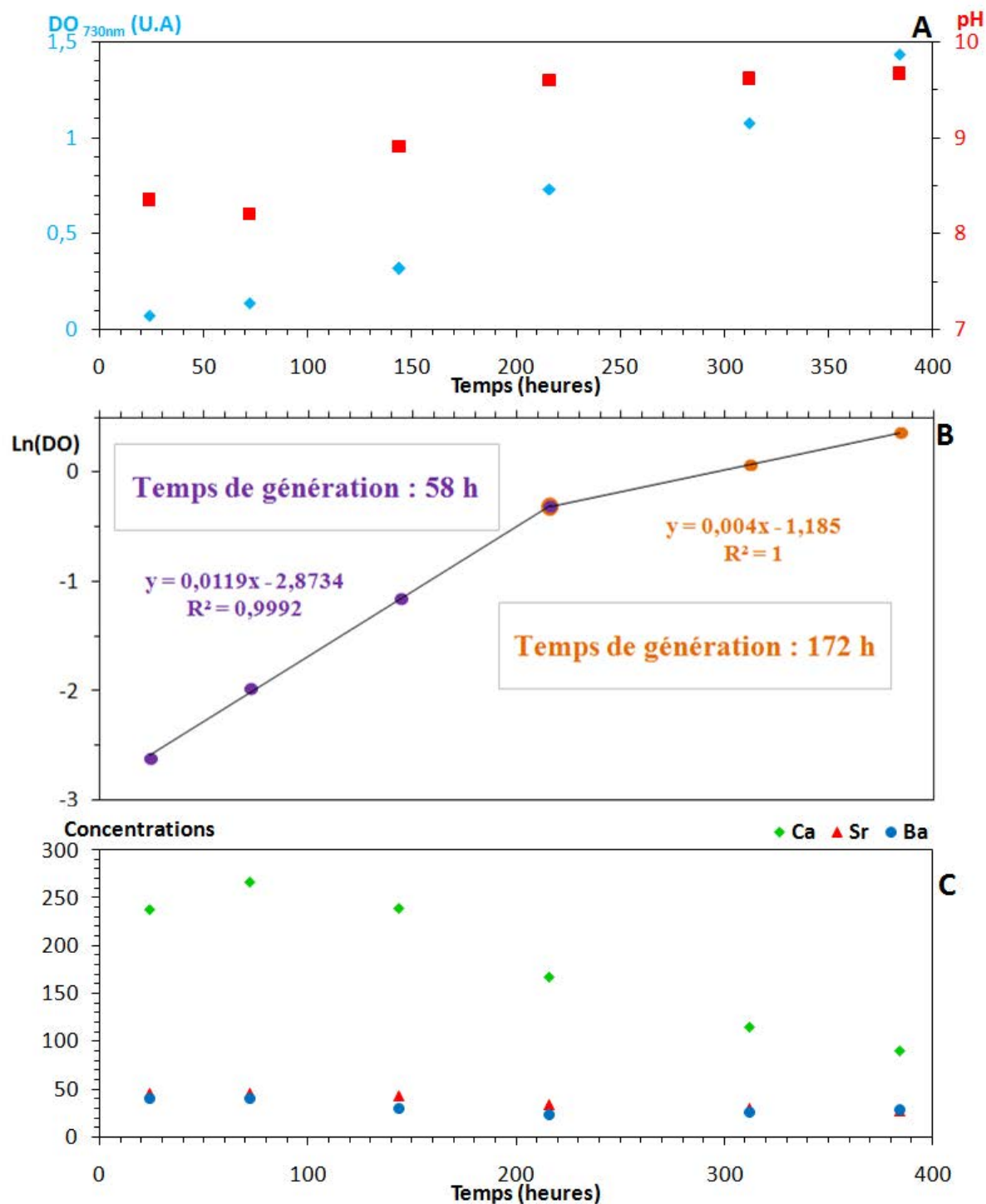


Figure 3.29 : Culture de *Synechococcus* sp. PCC 6312 sous lumière continue, à 30 °C dans le milieu BG-11 avec 50 μ M de strontium et 50 μ M de baryum. (A) DO et pH du milieu. (B) Logarithme népérien de la DO. (C) Concentration de calcium, strontium et baryum dans le milieu extracellulaire.

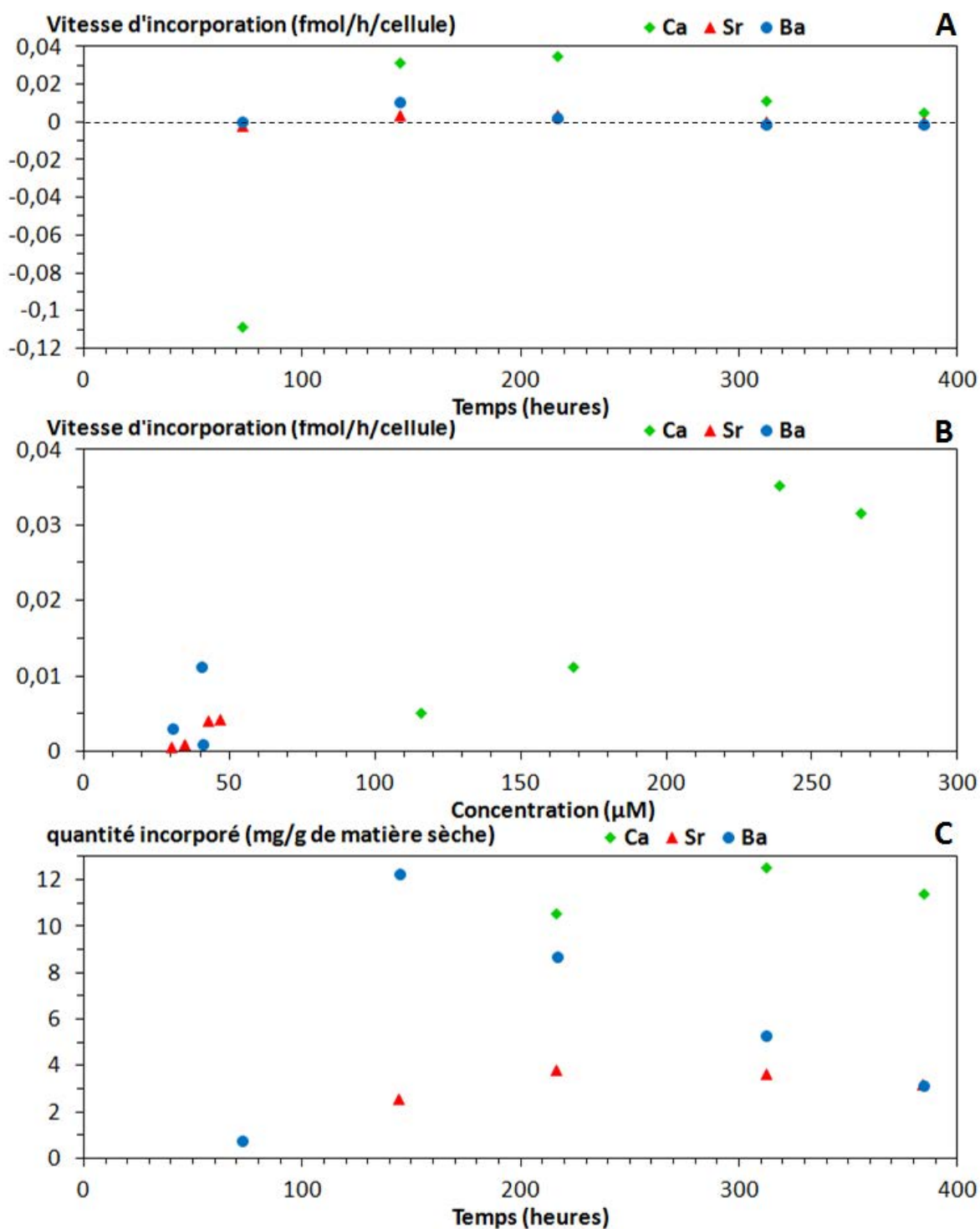


Figure 3.30 : Culture de *Synechococcus* sp. PCC 6312 sous lumière continue, à 30 °C dans le milieu BG-11 avec 50 μM de strontium et 50 μM de baryum. Vitesses d'incorporation du calcium, strontium et baryum, (A) en fonction de l'âge de la culture et (B) en fonction de leur concentration. (C) Quantités incorporés du calcium, strontium et baryum.

2.4. effet relatif du strontium et du baryum sur la croissance d'une culture de *Cyanothece* sp. PCC 7425

Cette série d'expériences a pour but de découpler les effets sur la croissance du calcium présent dans la composition du milieu BG-11 du strontium et du baryum. Des problèmes expérimentaux nous ont contraints à ne pouvoir suivre qu'une seule souche : la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425.

La même pré-culture a été utilisée pour incuber cette souche à 30 °C sous lumière continue dans plusieurs milieux :

- i) le milieu BG-11
- ii) le milieu BG-11 sans calcium
- iii) le milieu BG-11 sans calcium mais avec du strontium (50 μ M) et du baryum (50 μ M)
- iv) le milieu BG-11 qui contient déjà calcium (250 μ M) auquel on ajoute du strontium (50 μ M) et du baryum (50 μ M)

La Figure 3.31 montre le suivi de la DO ainsi que du pH de ces cultures.

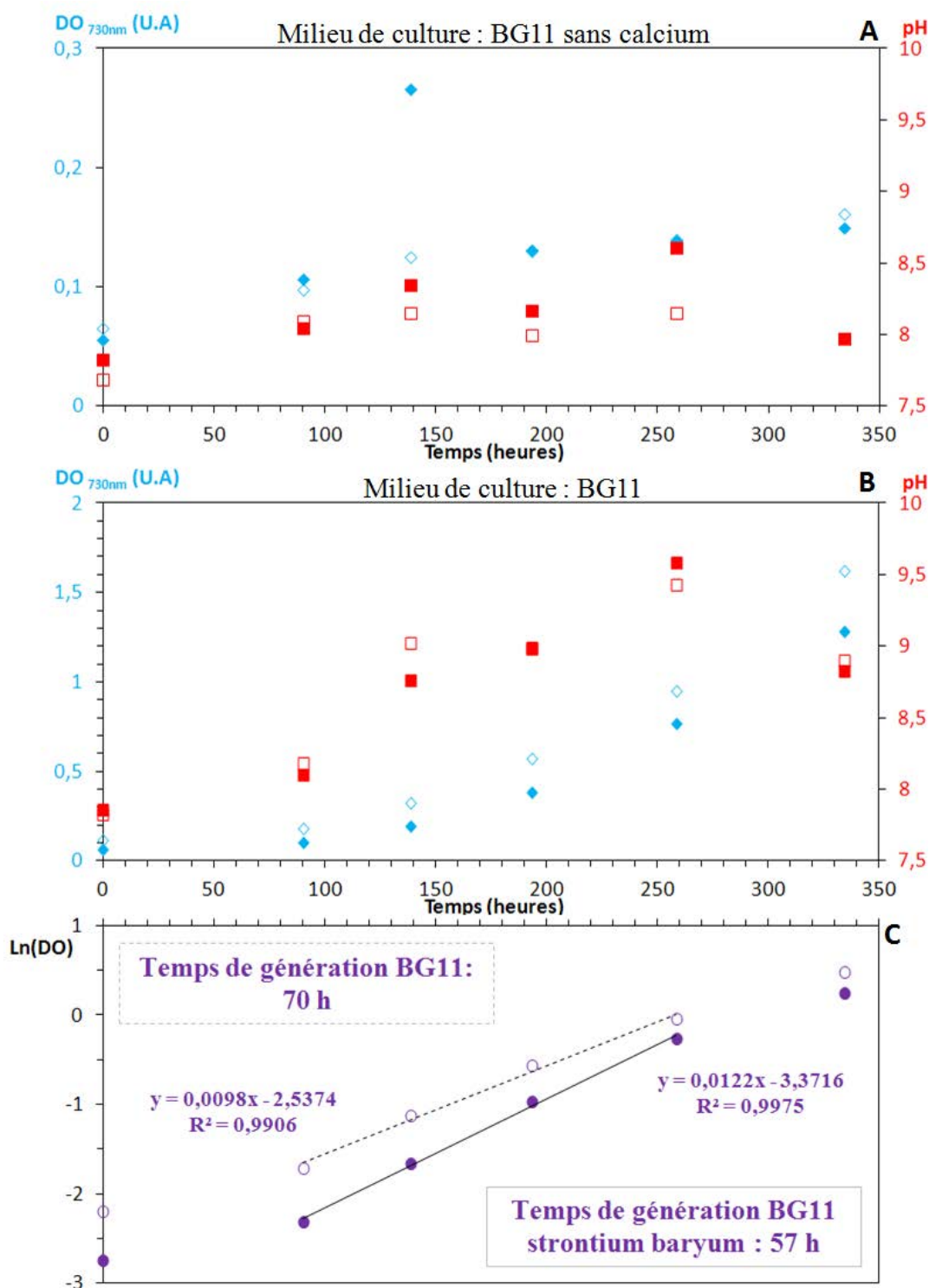


Figure 3.31 : Cultures de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 sous lumière continue, à 30 °C. (A) DO et pH d'une culture dans un milieu BG-11 sans calcium avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum (signes pleins) et d'une culture dans du BG-11 sans calcium, ni baryum, ni strontium (signes vides). (B) DO et pH de cultures dans un milieu BG-11 (250 µM de calcium) et avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum (signes pleins) et sans strontium ni baryum (signes vides). (C) Logarithme népérien de la DO en fonction du temps d'une culture dans un milieu BG-11 (avec calcium) avec 50 µM de strontium et 50 µM de baryum (signes pleins) et d'une culture dans du BG-11 sans baryum ni strontium (signes vides).

La culture sans calcium croît lentement (la DO passe de 0,05 à 0,15 en 340 h), ce qui signifie que le calcium est indispensable pour la multiplication de ces cellules. La culture sans calcium avec du strontium et du baryum ne croît pas non plus donc ni le strontium, ni le baryum à ces concentrations ne remplacent le calcium.

La culture dans du BG-11 uniquement et celle dans du BG-11 avec du strontium et du baryum sont comparés. Dans les deux cultures, la fin de la phase de croissance exponentielle se trouve entre 250 et 350 h. Le temps de génération pendant cette phase (Figure 3.31-C) est plus court pour la culture incubée avec du strontium et du baryum (57 h au lieu de 70 h). L'ajout de strontium et de baryum semble donc accélérer la croissance cellulaire. Néanmoins, dans les mêmes conditions, des cultures de cette souche dans du BG-11 (sans baryum ni strontium) ont montré des temps de génération plus courts sur des périodes plus courtes (temps de génération ~50 h sur les premières 150 h ; voir Chapitre 2, § 2.2). Avec et sans strontium et baryum, les profils d'augmentation de la DO et du pH sont semblables : à ces concentrations, aucun effet sur ces paramètres, bénéfique ou délétère, n'est observé.

3. Discussion

3.1. Implications de l'accumulation de strontium et de baryum

3.1.1. La dépollution d'environnements contaminés par des déchets radioactifs comme le ^{90}Sr

Lors de fuites de déchets radioactifs, le ^{90}Sr peut être l'un des principaux contaminants des milieux aqueux (Vakulovsky et al., 1994). C'est pourquoi différents moyens de séquestration du strontium ont été étudiés, comme l'utilisation de produits de synthèse (Manos et al., 2008) ou bien de microorganismes (Fukuda et al., 2014).

Plusieurs organismes capables de piéger le strontium et le baryum ont été découverts et étudiés dans le passé. La cyanobactérie *Nostoc carneum* peut accumuler le strontium probablement à sa surface (Pohl and Schimmack, 2006). Des algues (*Scenedesmus spinosus* ; *Oedogonium* sp. Nak 1001), des cyanobactéries (*Oscillatoria homogenea*, *Stigonema ocellatum* NIES-2131) ou encore des plantes aquatiques (*Egeria densa* We2) adsorbent le strontium à leur surface et en internalisent une partie (Dabbagh et al., 2007; Liu et al., 2014; Fukuda et al., 2014). D'autres peuvent précipiter de la strontianite (carbonate de strontium) comme la micro-algue *Chlorella vulgaris* cultivée dans un milieu contenant du $^{90}\text{SrCl}_2$ et du NaHCO_3 (Lee et al., 2014) ou les bactéries *Sporosarcina pasteurii* (ATC 11 859) et *Halomonas* sp.. Ces deux dernières sont des bactéries uréolytiques ; en dégradant l'urée, elles induisent la précipitation de carbonates qui incorporent du strontium comme substituant du calcium (Fujita et al., 2004; Achal et al., 2012; Lauchnor et al., 2013). De la même façon le coccolithophoridé *Emiliania huxleyi* incorpore le strontium et le baryum dans les coccolithes à des taux supérieurs en comparaison à ceux obtenus par la formation abiotique de calcite (Nehrke et al., 2007; Langer et al., 2009). Langer et al. (2009) déterminent des coefficients de partagesⁱ dans les coccolithes de 0,35 pour le strontium et de 0,1 pour le baryum et les comparent à ceux pour la calcite qui sont de 0,021 pour le strontium et de 0,012 pour le baryum (Tesoriero and Pankow, 1996). La levure *Saccharomyces cerevisiae* peut importer le strontium et l'accumuler dans sa vacuole (Avery and Tobin, 1992). Takahashi et al. (2015) ont observé dans l'algue *Bryopsis maxima* des rapports Sr/Ca et Ba/Ca, respectivement 67 et 8 328 fois plus grand que dans le milieu extérieur. La desmidiace (algue verte microscopique) *Closterium moniliferum* précipite dans sa vacuole des cristaux de sulfate de baryum et peut y incorporer le strontium (Krejci, Wasserman, et al., 2011). La diatomée (algue unicellulaire) *Thalassiosira weissflogii* possède des précipités d'hydroxydes de fer associés à sa surface sur lesquels le baryum s'adsorbe (Sternberg et al., 2005).

ⁱ Définie comme étant le rapport du rapport M/Ca dans la phase solide sur ce même rapport dans la phase liquide

Notre étude montre que les cellules formant des carbonates intracellulaires stockent une grande partie de la quantité mise initialement en solution (jusqu'à 100 %) que ce soit le baryum, le strontium ou le calcium. Les quantités accumulées par matière sèche des trois éléments confondus correspondent parfois à 20 % de la masse des cellules soit environ 2 mmol par gramme de matière sèche. Il est à noter que nous n'avons ici qu'une estimation minimale de la capacité de stockage des cellules de ces éléments puisqu'à la concentration maximale testée (250 μM), tout a été incorporé par les cellules. Par comparaison, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, incubée en présence d'1 mM de strontium, peut accumuler environ 20 mg de strontium par g de matière sèche soit 0,23 mmol/g (Avery and Tobin, 1992).

Pour ce qui est de l'adsorption à la surface des cellules, Pokrovsky et al. (2008) ont déterminé que la cyanobactérie *Gloeocapsa* sp. possédait une concentration totale de groupes fonctionnels protonés, autrement dit de sites de liaison de surface, d'environ 0,6-2,4 mmol/g sec. Néanmoins dans une solution contenant environ 50 μM d'ions métalliques (Cu, Zn, Pb ou Cd), une concentration adsorbée d'au maximum 45 $\mu\text{mol/g}$ humide est observée.

La micro-algue *Closterium moniliferum* peut précipiter dans sa vacuole jusqu'à 150 pg (1100 fmol) de baryum par cellule dans un milieu contenant 10 mg/L de baryum (73 μM) (Brook et al., 1988). La micro-algue forme des cristaux de barite (sulfate de baryum, produit de solubilité de $1,08 \cdot 10^{-10} \text{ M}^2$) dans sa vacuole. La célestine (sulfate de strontium, produit de solubilité de $3,81 \cdot 10^{-7} \text{ M}^2$) est plus soluble que la barite, et le gypse (sulfate de calcium, produit de solubilité de $3,14 \cdot 10^{-5} \text{ M}^2$) est encore plus soluble. Ces écarts de solubilité induisent une précipitation préférentielle du baryum par rapport au strontium et au calcium. La différence de solubilité des différentes phases cristallines impose une discrimination entre le calcium, strontium et baryum par la micro-algue. *Closterium moniliferum* a besoin d'un grand rapport Sr/Ba en solution (~486 dans Krejci, Finney, et al., 2011) pour piéger un maximum de strontium. Pour déterminer les capacités à accumuler le strontium de la micro-algue, Krejci, Finney, et al. (2011) l'ont placée en présence de 170 μM de strontium et 0,35 μM de baryum. Ce microorganisme a montré une capacité d'accumuler du strontium de $\sim 1,7 \text{ fmol.h}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$ ce qui correspond à 4,3 nmol de strontium par litre de culture.

L'algue *Scenedesmus spinosus* cultivée dans un milieu simulant une contamination par des déchets radioactifs peut piéger 76 % des 114 μM de strontium présents dans la solution atteignant un rapport massique d'environ 2,5 mg de strontium par g de matière sèche principalement adsorbée à la surface des cellules (Liu et al., 2014). Cette algue a montrée une grande capacité de biosorption sélective pour le strontium.

La culture de C7 dans BG-11 avec 245 μM de strontium et 245 μM de baryum a accumulé successivement le baryum et le strontium en 500 h, ce qui fait environ 0,5 μM

de strontium ou de baryum par heure soit près de 60 fois plus vite que la culture de micro-algue *Closterium moniliferum*.

Pendant une période, le pourcentage massique de strontium accumulé dans la culture de *G. lithophora* est de 75 mg/g de matière sèche soit une quantité 30 fois plus élevée que ce qui est observé pour l'algue *Scenedesmus spinosus*.

La culture de *G. lithophora* C7 a montré une vitesse d'accumulation du strontium de 0,79 fmol.h⁻¹.cellule⁻¹ ce qui est 2 fois moins vite que la vitesse d'incorporation de la cellule *Closterium moniliferum* et la quantité de baryum incorporée par *G. lithophora* est de 64 fmol par cellule (contre 1 100 fmol chez *Closterium moniliferum*).

Mais *G. lithophora* est au moins 80 000 fois plus petite. Individuellement la cyanobactérie C7 accumule un peu moins vite le strontium mais sa petite taille (1-2 µm) permet de travailler avec des densités très grandes de cellules dans une culture.

La plus haute concentration en strontium ou baryum testée avec la souche C7 est de 250 µM. Dans ces conditions, les cyanobactéries sont capables de tout incorporer (la quantité restante en solution est en dessous de notre limite de détection) contrairement aux autres.

Il sera nécessaire dans le futur de faire d'autres cultures dans des conditions plus concentrées en strontium afin de déterminer la capacité maximale de la souche C7 à piéger le strontium ou le baryum.

Hormis la résistance à la radioactivité qui n'a pas été testée, la souche *G. lithophora* C7 possède donc des caractéristiques intéressantes pour remédier au problème de pollution par des alcalino-terreux, notamment le strontium et possiblement le ⁹⁰Sr, problème survenant notamment lors de certains accidents nucléaires comme celui de Fukushima par exemple (Fukuda et al., 2014).

Fukuda et al. (2014) présentent des micro-organismes aquatiques qui possèdent des capacités d'accumulation des radionucléides. Ils attribuent cette capacité à la paroi cellulaire. Les auteurs présentent les multiples intérêts de ce type d'organisme. En effet, les algues et les cyanobactéries sont phototrophes : elles ne nécessitent donc pas beaucoup de nutriments. Elles peuvent être facilement cultivées en masse, récupérées et séchées afin de retirer définitivement les polluants des zones contaminées.

Fukuda et al. (2014) ont cherché un bon candidat pour éliminer la plus grande variété possible de radionucléide (césium, strontium et iode) et qui puisse se développer dans différents milieux, notamment en milieu marin. Les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires sont de très bons candidats, répondants aux mêmes points que ceux expliqués par Fukuda et al. (2014). En effet les cyanobactéries sont phototrophes, peuvent être facilement cultivées en masse et être récupérées. Néanmoins, jusqu'ici aucune souche marine de cyanobactérie n'a montré de carbonate intracellulaire et nous n'avons pas non plus testé d'autres éléments polluants comme le césium et l'iode.

Par contre les souches de cyanobactéries qui forment des carbonates intracellulaires ont des milieux naturels d'origines variées en température : certaines sont thermophiles et viennent de sources chaudes et d'autres de lacs situés en altitude et vivent sous des températures plus basses. Le grand intérêt des cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires est leur très grande capacité de stockage et le fait d'incorporer le strontium jusqu'à des valeurs très basses de concentration dans le milieu. En effet la limite de détection de l'analyse par ICP-AES est de 0,046 μM en considérant la dilution faite (la déviation standard sur la mesure du blanc est plus faible).

Le strontium et le baryum sont incorporés notamment dans les carbonates amorphes intracellulaires. Ce sont des phases que l'on sait relativement labiles car très solubles ($K_s = 2,32 \pm 0,41 \cdot 10^{-8} \text{ M}^2$ à pH 9, Kellermeier et al., 2014). Mais nous avons vu ici qu'il n'y a pas de relargage significatif lorsque les souches sont placées à l'obscurité pendant au moins 400 h. La souche *G. lithophora* C7 en particulier possède une forte discrimination du strontium envers le calcium dû à une accumulation séquentielle ce qui la rend très intéressante dans un milieu contenant une grande quantité de calcium par rapport au strontium.

3.1.2. L'effet de grandes concentrations intracellulaires en strontium et en baryum sur la physiologie

Le milieu intracellulaire des cellules vivantes contient du calcium. Sa concentration est régulée chez les eucaryotes et chez les bactéries (Gangola and Rosen, 1987) et il a un rôle de signal chez les procaryotes (Norris et al., 1996; Dominguez, 2004). Le strontium est connu et utilisé comme un analogue du calcium qui se comporte de la même façon vis-à-vis des mécanismes biologiques. C'est le cas par exemple dans les plaquettes où le strontium peut être stocké et relargué de manière similaire au calcium alors que le baryum, lui, peut être stocké mais pas relargué (Ozaki et al., 1992). Usachev et Mironov (1989) ont montré que le strontium pouvait être internalisé via un canal ionique dans des cellules nerveuses et induire la même réponse que le calcium mais que le baryum bloque ce canal ionique.

Il a été proposé que certains organismes possèdent des systèmes pour réguler la concentration en strontium dans le milieu quand celle-ci devient trop toxique. Brown et al. (2006) ont montré que la protéobactérie *Shewanella oneidensis* synthétise des sidérophores pour précipiter le strontium du milieu.

Boussac et al. (2004) ont cultivé la souche *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 dans un milieu où le calcium a été remplacé par le strontium. Pour rappel cette souche qui fait partie du même clade (groupe monophylétique) que *S. calcipolaris* et PCC 6312 forme aussi des carbonates intracellulaires. Leur objectif était d'étudier le fonctionnement du photosystème II. Le photosystème II permet l'oxydation de l'eau en oxygène, c'est un complexe enzymatique qui possède un cluster comprenant 4 atomes de manganèse, 5 atomes d'oxygène et 1 atome de calcium. Boussac et al. (2014)

montrent que le strontium a substitué intégralement le calcium dans son rôle de cofacteur avec 1 atome de strontium pour 4 atomes de manganèse. Les propriétés catalytiques du photosystème II purifié à partir des cellules ont diminué avec notamment une activité oxygénique plus faible. Pourtant ils ne constatent pas de modification dans la croissance de la bactérie. Nous n'avons pas constaté le même comportement pour PCC 7425 où l'absence de calcium ne permet pas la croissance.

Un autre effet du strontium a été observé dans une culture de *Synechococcus* RF-1, souche capable de fixer du N₂ : le calcium permet de protéger les nitrogénases de la cyanobactérie qui sont inactivées par l'oxygène. Le remplacement du calcium par le strontium permet de protéger l'enzyme mais de façon moins efficace (Chen et al., 1988).

Lors de toutes nos cultures en milieux contrôlés contenant du strontium et du baryum, la morphologie des cellules reste inchangée ainsi que les profils de croissance des cultures si l'on compare au milieu sans strontium ni baryum ; pourtant les concentrations en strontium et baryum étaient relativement élevées (50 ou 250 µM). A priori ni le strontium ni le baryum n'affecte ces organismes même si nous n'avons pas regardé les complexes susceptibles d'être altérés comme le photosystème II.

Nous avons vu dans nos cultures que la souche *G. lithophora* C7 formait des carbonates riches en strontium et en baryum. Dans les aquariums d'où a été isolée la souche C7, la concentration en calcium est plus faible (47 µM) que dans BG-11 et les concentrations en strontium et baryum y sont nettement plus faibles que celles utilisées au cours de cette thèse (12 nM pour le strontium et 1,2 nM pour le baryum ; Couradeau et al., 2012). Pourtant, ces cellules contiennent de grandes quantités de strontium et de baryum dans les aquariums. Cependant l'aquarium est un réservoir infini comparé aux cultures que nous faisons dans le BG-11. L'aquarium contient les roches du milieu naturel et ces roches peuvent se solubiliser au fur et à mesure que les cyanobactéries accumulent le calcium, le strontium et le baryum.

La question qui se pose est : y a-t-il un avantage évolutif pour la souche *Gloeomargarita lithophora* C7 à incorporer sélectivement le baryum et le strontium par rapport au calcium ?

Son milieu de vie ne contenant que très peu de calcium en solution, il est possible que le strontium et le baryum soient devenus des substituts. Néanmoins, leur concentration dans le milieu est encore bien plus faible.

Les autres souches testées de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires n'incorporent pas préférentiellement le strontium et le baryum : cette sélectivité n'est donc pas inhérente au processus de précipitation intracellulaire. Le milieu naturel de C7 est aussi celui de *Synechococcus calcipolaris* G9. Pourtant cette souche n'importe pas sélectivement le baryum et le strontium.

3.2. Mécanisme d'accumulation du strontium et du baryum et sélectivité vis-à-vis du calcium

Les cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires piègent le strontium et le baryum : soit quand il n'y a plus beaucoup de calcium dans le milieu comme les souches *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus calcipolaris* G9 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 ; soit de façon préférentielle au calcium comme pour la souche *Gloemargaritha lithophora* C7. Cette dernière est capable de former des carbonates hétérogènes en composition en incorporant de façon séquentielle les différents ions alcalino-terreux présents dans la solution (le baryum puis le strontium puis le calcium). En présence des trois éléments, *G. lithophora* C7 est capable de former de nouveaux carbonates très purs de baryum et s'il n'y a que du calcium et du strontium elle peut sélectivement ne précipiter que le strontium. Les synthèses abiotiques (Chapitre 1) ont montré qu'il n'y a pas de différence importante d'incorporation du strontium, du baryum et du calcium dans des carbonates amorphes synthétisés abiotiquement. De plus, les différents produits de solubilité à 25 °C des phases cristallines de carbonate ne vont pas dans le sens de l'incorporation observée. En effet, les produits de solubilité sont : $3,47 \cdot 10^{-9} \text{ M}^2$ pour la calcite (calcium), $7,41 \cdot 10^{-10} \text{ M}^2$ pour la strontianite (strontium) et $2,75 \cdot 10^{-9} \text{ M}^2$ pour la withérite (baryum) (Millero et al., 1984). Ainsi, la sélectivité observée au niveau de la souche C7 est liée à un processus biologique. Le fait que toutes les souches de cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires ne fractionnent pas le strontium, le baryum et le calcium apporte un argument supplémentaire pour l'importance du contrôle biologique par les cellules de *G. lithophora* C7 sur l'incorporation du strontium et du baryum dans la formation des carbonates intracellulaires.

On peut voir le système de la cyanobactérie comme tel :

Une membrane à travers laquelle peuvent circuler dans un sens et dans l'autre le calcium, le strontium et le baryum. Il y a donc des molécules (transporteurs membranaires, canaux ioniques, porines ...) qui permettent l'entrée des éléments et d'autres qui permettent la sortie vers le milieu extracellulaire. La surconcentration du baryum serait donc due à un flux résultant entrant plus grand que celui du strontium qui lui serait plus grand que celui du calcium. Ce flux résultant peut être soit dû à une sélection dans l'entrée des cations ($\text{Ba} \gg \text{Sr} \gg \text{Ca}$) ou bien dans la sortie des cations ($\text{Ca} \gg \text{Sr} \gg \text{Ba}$). On peut aussi imaginer une membrane vésiculaire qui sépare les inclusions de carbonates du milieu intracellulaire et que la sélection se fasse au niveau de cette membrane et non au niveau de la membrane du cytoplasme. Il est également possible qu'il y ait un réservoir transitoire entre le milieu intracellulaire et la précipitation de carbonates qui induit une sélection des cations et relargue ces cations

vers le réservoir où a lieu la précipitation de carbonates. On peut aussi penser à un piège qui diminue les concentrations en calcium et strontium disponibles dans la cellule ce qui augmente la proportion relative de baryum disponible. La précipitation sélective de carbonates peut donc être expliquée par l'un ou plusieurs de ces 5 éléments du système :

- 1) L'entrée des éléments dans le cytoplasme
- 2) La sortie de ces éléments vers le milieu extracellulaire
- 3) une membrane vésiculaire sélective autour des carbonates
- 4) un réservoir transitoire sélectif
- 5) un piège intracellulaire sélectif

La Figure 3.32 présente le système avec les différents acteurs possibles de cette sélection.

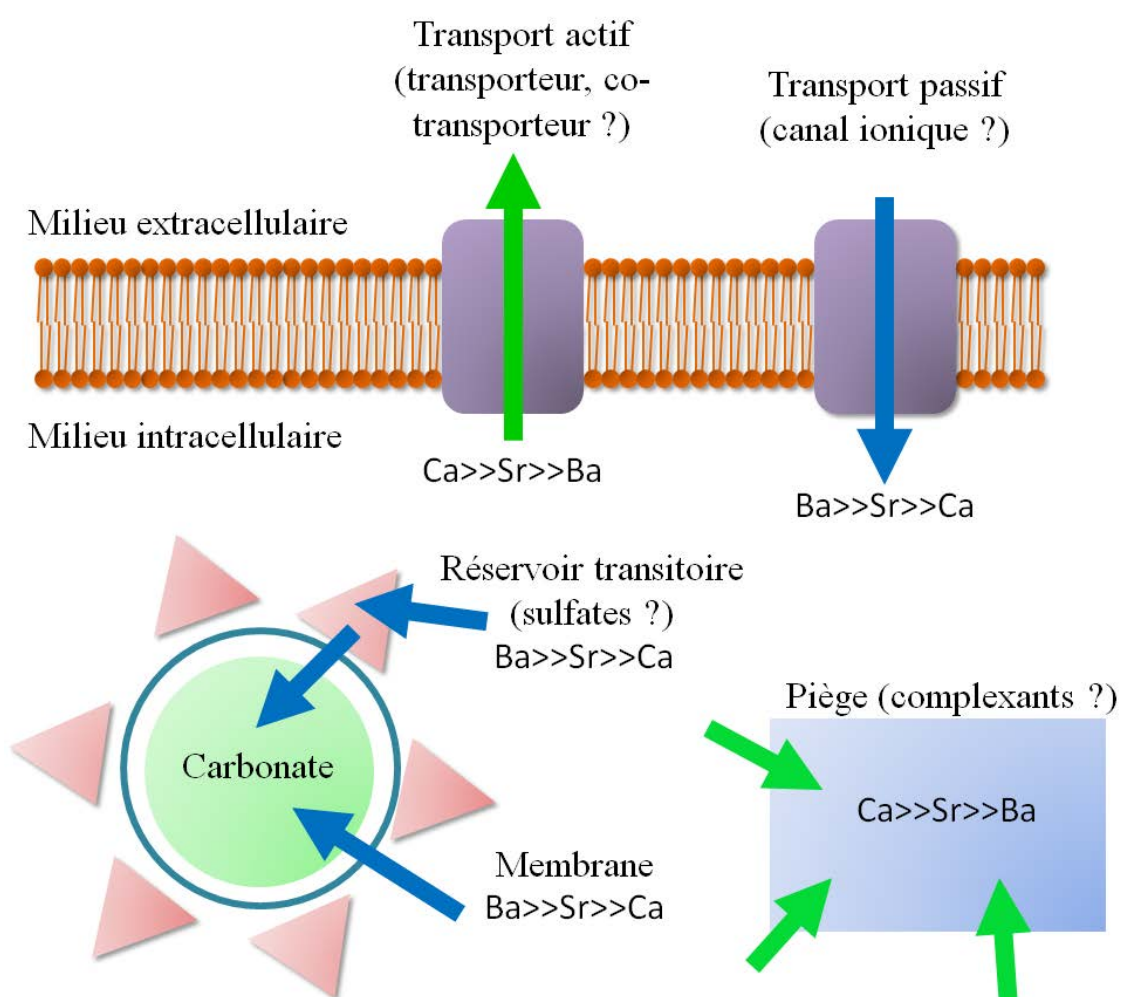


Figure 3.32 : Schéma des différentes hypothèses pour expliquer la sélectivité observée dans les carbonates intracellulaires de la souche *Gloeomargarita lithophora* C7 : un canal ionique sélectif du baryum, un transporteur exportant sélectivement le calcium, un réservoir transitoire incorporant sélectivement le baryum, un piège complexant sélectivement le calcium et une membrane sélective du baryum.

3.2.1. Hypothèse 1 : L'entrée des éléments dans le cytoplasme

On pourrait expliquer la précipitation sélective de carbonates de baryum, puis de strontium, puis de calcium, par des canaux ioniques qui permettent le passage des ions (calcium, strontium et baryum) du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule. Ce type de transport va dans le sens du gradient électrochimique, c'est donc un transport passif (qui ne nécessite pas d'énergie pour la cellule). Ce canal aurait une plus grande affinité pour le baryum que pour le strontium et une plus grande affinité pour le strontium que pour le calcium. Quand les cellules sont en présence des 3 cations, tous les transporteurs membranaires sont saturés par le baryum et il est le seul à rentrer dans la cellule par cette voie. Quand il n'y a plus de baryum, le strontium ayant une plus grande affinité pour le canal ionique, le sature à son tour ce qui empêche le calcium d'entrer dans la cellule par cette voie d'internalisation.

3.2.2. Hypothèse 2 : La sortie de ces éléments vers le milieu extracellulaire

On peut aussi imaginer que les trois cations entrent dans la cellule de façon égale et expliquer la surconcentration de baryum par rapport au strontium et du strontium par rapport au calcium par un transporteur qui exporte sélectivement le calcium puis le strontium puis le baryum vers le milieu extérieur. Cette exportation se fait contre le gradient électrochimique, il s'agit donc d'un transport actif qui peut se faire soit par une consommation d'ATP, soit via un co-transporteur qui exporte un autre ion selon son gradient (symport) ou qui importe un ion selon son gradient en exportant le calcium, le strontium ou le baryum (antiport).

Dans ces deux hypothèses la précipitation intracellulaire préférentielle du carbonate de baryum par rapport au strontium et au calcium vient d'une concentration en baryum dans la cellule plus élevée que celle du strontium et du calcium. L'enrichissement séquentiel des carbonates en baryum puis strontium puis calcium se retrouve dans les compositions des polyphosphates. En effet lors des différentes phases d'accumulation de baryum, strontium et calcium on remarque que les polyphosphates s'enrichissent en l'élément incorporé, cependant on ne voit pas de polyphosphates ne contenant qu'un de ces éléments. Ceci est compatible avec l'hypothèse que l'accumulation sélective de *G. lithophora* C7 se fait via la membrane cellulaire.

3.2.3. Hypothèse 3 : Une membrane vésiculaire sélective autour des carbonates

De la même façon que l'on peut imaginer les mécanismes qui régissent les flux de calcium, strontium et baryum à travers la membrane cellulaire, on peut transposer l'import et l'export des éléments à travers une membrane située autour des carbonates.

De nombreux organismes sont capables d'internaliser le calcium. Schumaker and Sze (1986) décrivent une accumulation de calcium dans la vacuole des cellules racinaires de l'avoine. Cette accumulation est permise par le fonctionnement d'un transporteur échangeur de proton qui est également capable de transporter le strontium et le baryum avec des affinités décroissantes ($\text{Ca} > \text{Sr} > \text{Ba}$). Reusch et al. (1995) ont montré l'existence d'un canal calcique dans la membrane d'*Escherichia. coli* formé d'un polymère lipidique complexé avec un polyphosphate de calcium. Ce canal n'est pas sélectif entre le calcium, le strontium ou le baryum. Il existe aussi un mécanisme d'internalisation du calcium dans les mitochondries (Kirichok et al., 2004). Le canal associé est sélectif : il ne différencie pas le strontium du calcium mais internalise très peu le baryum. Le complexe d'oxydation de l'eau du photosystème II intervenant dans la photosynthèse possède également cette grande sélectivité pour le calcium et pour le strontium. Cette spécificité est déterminée par la taille du site de liaison de la protéine et la densité de charge des ligands présents dans ce site (Vrettos et al., 2001). L'importance de la structure de la protéine entre également en jeu pour d'autres sites de liaison du calcium comme les motifs de type EF-hand. Ce motif structural formé d'hélice α est présent dans beaucoup de protéines eucaryotes capables de lier le calcium (Henikoff et al., 1997) et il existe des analogue chez les procaryote (van Asselt et al., 1999). Là encore, la taille de la cavité du site de liaison et la densité de charge dans ce site conditionnent les différentes constantes de liaison du calcium, du strontium et du baryum (Falke et al., 1991). Il en résulte des différences de plusieurs ordres de grandeur.

Pour ce qui est de la souche *Gloemargarita lithophora* C7, la sélectivité d'incorporation ne va pas en faveur du calcium mais plutôt en faveur du strontium et du baryum. Aucune protéine liant préférentiellement le baryum puis le strontium puis le calcium n'a encore été découverte. Cela pourrait favoriser l'hypothèse d'une sélectivité liée à l'export différentielle du calcium par rapport au strontium et au baryum. Le calcium et le strontium seraient exportés plus efficacement que le baryum. Ce dernier est donc en plus grande concentration dans le cytoplasme et le carbonate résultant est un carbonate de baryum. Néanmoins lorsque la totalité du baryum a précipité, il se forme des carbonates de strontium, ce qui signifie que le strontium n'est plus suffisamment exporté. Une explication à ce phénomène serait que ce transporteur soit dépendant de l'osmolarité ou de la quantité en calcium, strontium et baryum du milieu intracellulaire.

3.2.4. Hypothèse 4 : Un réservoir transitoire sélectif

Une autre hypothèse est celle d'un réservoir transitoire entre le milieu intracellulaire et la zone de précipitation des carbonates. Ce réservoir prend préférentiellement le baryum puis le strontium puis le calcium du cytoplasme et relargue en même temps, ou de façon découplée dans le temps, les éléments au niveau des carbonates. Un bon candidat serait des sulfates : en effet, les différences de solubilité des sulfates de calcium ($3,14 \cdot 10^{-5} \text{ M}^2$), de strontium ($3,81 \cdot 10^{-7} \text{ M}^2$) et de baryum ($1,08 \cdot 10^{-10} \text{ M}^2$) vont dans le sens de ce que l'on observe dans les carbonates de *G. lithophora* C7. Il est donc envisageable que des sulfates précipitent dans le cytoplasme de la cyanobactérie, comme dans la vacuole de la micro-algue *Closterium moniliferum* (Krejci, Wasserman, et al., 2011), puis que ces sulfates se dissolvent près des carbonates. Ainsi la phase liquide environnante des carbonates est enrichie en baryum et il y a précipitation de carbonate de baryum. Néanmoins quand on observe les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires, on peut voir par EDXS qu'elles contiennent du soufre mais pas spécifiquement associés aux carbonates. Il se peut que ce soit des molécules sulfatées qui piègent le calcium, le strontium et le baryum en exerçant une sélection et libèrent ces éléments lors de la précipitation des carbonates intercellulaires.

3.2.5. Hypothèse 5 : Un piège intracellulaire sélectif

La dernière hypothèse est la présence d'un piège intracellulaire qui possède une affinité plus grande pour le calcium puis pour le strontium puis pour le baryum. Chacun des éléments est donc libéré au fur et à mesure que les carbonates précipitent. Ce piège peut être une molécule qui complexe préférentiellement le calcium comme l'EDTA (Griko, 1999) ou une protéine ayant un site actif spécifique comme les motifs de type EF-hand ou le complexe d'oxydation de l'eau du photosystème II. Il y aurait donc compétition entre la précipitation et le piégeage des ions. Le baryum précipite lorsque le strontium et le calcium sont piégés et, quand il n'y a plus de baryum, seul le calcium est piégé. On a vu qu'une partie non négligeable du calcium intracellulaire était vraisemblablement associée à d'autres réservoirs que les carbonates, soit les polyphosphates et/ou des protéines du cytoplasme ce qui rend cette hypothèse possible. Si l'hypothèse d'une sélectivité par un piège intracellulaire est vraie, alors il y a un contrôle qui dépend là encore de l'osmolarité ou de la quantité totale de calcium, strontium et baryum.

Les résultats montrent que sur les 4 souches cultivées dans un milieu contenant du strontium et du baryum, seule une (*Gloeomargarita lithophora*) prend de façon sélective le baryum et le strontium vis-à-vis du calcium. Il est possible que cette caractéristique particulière soit totalement indépendante du mécanisme de précipitation des carbonates intracellulaires ou au contraire qu'elle révèle plusieurs voies de

formation de ceux-ci. *G. lithophora* C7 aurait donc un mécanisme différent qui induirait une précipitation sélective. Chez cette souche, il est possible de voir des inclusions de carbonate de calcium avec des couches de carbonate riches en baryum et des carbonates de calcium pur. Cela signifie soit (1) que la précipitation intracellulaire de carbonate n'a pas lieu partout dans la cellule au même moment et que certaines zones de la cellule sont saturées en carbonates et d'autres non ou bien (2) que la sélectivité ne se fait pas au niveau de la membrane mais plus proche des carbonates (i.e. un piège intracellulaire local, un réservoir transitoire ou une membrane autour des carbonates).

Les résultats sur d'autres souches vont également dans le sens d'une sélection proche des inclusions. Dans les études sur la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425, le calcium, strontium et baryum ne sont pas pris de façon identique par les différentes inclusions. Pendant la croissance de la culture, dans un premier temps, seul le calcium est internalisé, les concentrations en strontium et en baryum diminuent uniquement quand le calcium est suffisamment peu concentré. Également le strontium semble être privilégié par rapport au baryum et même par rapport au calcium vers la fin de l'expérience. De plus, en microscopie, on peut voir, dans une cellule, des inclusions avec des rapports différents de calcium, strontium et baryum. Les carbonates ont donc été formés soit dans des environnements chimiques différents (composition en calcium, strontium et baryum) ou à des temps différents. Dans les deux cas, les particules ne « voient » pas toutes le même environnement chimique dans une même cellule. Cet « isolement » chimique, qui peut être dû à un réservoir transitoire, un piège ou encore à une membrane, peut expliquer les différences entre les inclusions.

4. Conclusion

Nous avons étudié plusieurs cultures de différentes souches formant des carbonates intracellulaires. Le suivi des concentrations du calcium, strontium et baryum en solution a permis de déterminer que les cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires accumulent le calcium mais peuvent aussi accumuler le strontium et le baryum. De plus une souche (*Gloeomargarita lithophora* C7) précipite sélectivement le baryum, puis le strontium, puis le calcium. Les capacités maximales de stockage de ces éléments par ces souches n'ont pas été testées et pourtant celles-ci sont déjà particulièrement élevées dans nos conditions. Le couplage des données avec les observations faites en microscopie électronique permet d'affiner la description du processus d'accumulation. La compréhension du ou des mécanismes impliqués reste complètement ouverte. L'hypothèse d'un transporteur qui importe préférentiellement dans la cellule le baryum par rapport au strontium et de la même manière le strontium par rapport au calcium devra être testé. Cela impliquerait que ce transporteur serait relativement différent pour C7 par rapport aux autres souches. L'utilisation de poisons plus ou moins spécifiques à certains transporteurs ou canaux ioniques permettrait de tester si l'on garde la sélectivité ou non et ainsi d'identifier des acteurs dans ce processus. L'effet de la lumière a également été testé : celle-ci semble indispensable pour la formation de carbonate et l'accumulation de calcium, strontium et baryum. L'importance de la lumière et donc de la photosynthèse doit être approfondie notamment par le suivi de la composition du milieu et de la composition des inclusions sur plusieurs cycles jour/nuit.

5. Perspectives

5.1. Le rôle de la photosynthèse

Dans notre étude aucune donnée ne nous éclaire pour déterminer si cette contribution de la photosynthèse se fait au niveau de la précipitation ou bien au niveau de l'internalisation comme chez la souche *Nostoc* MAC (Pandey et al., 1996) qui peut internaliser le calcium en utilisant l'énergie de la photosynthèse.

Déterminer les concentrations intracellulaires en calcium, strontium et baryum libres pendant la formation des carbonates (avec lumière) et en condition d'obscurité permettront d'une part de mieux comprendre le fonctionnement de l'accumulation en strontium et en baryum et d'autre part de connaître les conditions de sursaturation intracellulaire expliquant la précipitation de carbonate. Il serait aussi intéressant d'utiliser comme Pandey et al. (1996) des découplants et des inhibiteurs pour comprendre la régulation possible par la photosynthèse.

5.2. L'étendue du phénotype d'accumulation sélective du strontium et du baryum

Le strontium et le baryum sont utilisés comme des indicateurs des environnements océaniques passés (Lowenstam, 1961; Dymond et al., 1992). Dans cette étude, seule la souche *Gloeomargarita lithophora* C7 accumule sélectivement le strontium et le baryum. Les souches *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Synechococcus calcipolaris* G9 ont été cultivées dans un milieu contenant du strontium et du baryum. Et aucune n'a montré de préférence pour le baryum. *Cyanothece* sp. PCC 7425 a montré au contraire une préférence pour le calcium puis pour le strontium. Néanmoins, ces souches ont montré qu'elles pouvaient précipiter le strontium et le baryum quand il n'y a pas de calcium accessible. Il faut déterminer quelle est la quantité de cyanobactéries capables de précipiter le strontium et le baryum à l'échelle d'un biotope et en quelle proportion cette population modifie le milieu (concentration en calcium, strontium, baryum et biominéraux formés).

Il serait aussi intéressant de déterminer la proportion d'éléments présents dans les carbonates par rapport au reste de la cellule comme le cytosol, les polyphosphates et autres possibles lieux d'accumulation.

5.3. Les capacités de dépollution de *Gloeomargarita lithophora*

La souche *G. lithophora* C7 a montré des aptitudes intéressantes pour des applications de dépollution des milieux contaminés par des déchets radioactifs. Les cultures faites ici montrent une sélection et une accumulation particulière. Il est important d'aller plus loin dans la faisabilité et cultiver cette souche dans des milieux de même composition et dans les mêmes paramètres (température et cycle jour/nuit) que des milieux contaminés par du ^{90}Sr . Dans la même optique, des tests sur la résistance à la radioactivité doivent être réalisés. Les quantités stockées par les cyanobactéries sont intéressantes mais nous n'avons pas testé le maximum d'incorporation de ces organismes. Notre étude sur l'incorporation du calcium, du strontium et du baryum par *G. lithophora* résulte de ce qui a été observé dans le milieu naturel de la bactérie. Il est possible que la cellule puisse internaliser d'autres éléments notamment le Ra (radium), élément radioactif qui, comme le calcium, le strontium et le baryum, est un alcalino-terreux.

Conclusion générale

Les cyanobactéries formant des carbonates de calcium amorphes intracellulaires ont été décrites pour la première fois dans par Couradeau et al. (2012) . Cette découverte posait la question des conditions présentes dans la cellule pour permettre la précipitation de ces minéraux. Les conditions extracellulaires nécessaires ont également été étudiées. La stabilité et donc le devenir de ces carbonates était et est toujours un point important pour la possibilité de retrouver des traces de vie de cyanobactéries similaire dans le passé. L'enrichissement en strontium et en baryum observé dans les carbonates de calcium intracellulaires posait la question du lien avec la formation des carbonates et de l'inhérence des deux phénomènes.

Les expériences et les observations réalisées au cours de cette thèse ont permis d'avancer dans la compréhension de la formation des carbonates intracellulaires par certaines cyanobactéries. Il est possible de reproduire des carbonates ayant les mêmes caractéristiques que ceux observés dans *Gloeomargarita lithophora* sans utiliser de molécule biologique. Les cyanobactéries peuvent former des carbonates quand leur milieu environnant est sous-saturé. La précipitation est donc possible via un processus actif par les cellules. Ces espèces formant des carbonates intracellulaires ont une forte affinité pour le calcium comparé aux espèces n'en formant pas. Cette affinité imposée est, d'ailleurs, différente en fonction de l'espèce. Il est aussi possible que l'alcalinité exportée par la cellule vers le milieu extérieur soit moins grande pour les cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires.

L'enrichissement en strontium et en baryum des carbonates de calcium n'est observé, pour le moment, que pour la souche *G. lithophora* C7. Il s'agit d'un mécanisme de sélection qui internalise préférentiellement le baryum puis le strontium puis le calcium dans la cellule. Cette sélection ne vient pas de la précipitation des carbonates. L'accumulation séquentielle de quantités importantes de baryum, de strontium et de calcium dans les carbonates intracellulaires ouvre des possibilités d'utilisation de ces cyanobactéries dans les problématiques de dépollution et pose aussi la question de l'impact et l'importance de ces bactéries sur la géochimie des milieux naturels.

Les cyanobactéries ne forment des carbonates qu'en présence de lumière. La précipitation des inclusions est possible via un processus actif ; il est probable que l'énergie générée la photosynthèse soit utilisée dans ce but.

Les carbonates de calcium amorphes sont peu stables et peuvent cristalliser en solution ou à haute température. La nécessité d'un procédé actif (biologique) pour former les carbonates intracellulaire laisse penser qu'à la mort de la cellule, les inclusions se dissoudront ou cristalliseront rapidement. La surconcentration du baryum et du strontium semble être une piste plus plausible dans la recherche de fossiles bactériens.

Bibliographie

- Achal V., Pan X. and Zhang D. (2012) Bioremediation of strontium (Sr) contaminated aquifer quartz sand based on carbonate precipitation induced by Sr resistant *Halomonas* sp. *Chemosphere* **89**, 764–768.
- Addadi L., Raz S. and Weiner S. (2003) Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization. *Adv. Mater.* **15**, 959–970.
- Aizenberg J., Lambert G., Addadi L. and Weiner S. (1996) Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates. *Adv. Mater.* **8**, 222–226.
- van Asselt E. J., Dijkstra A. J., Kalk K. H., Takacs B., Keck W. and Dijkstra B. W. (1999) Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand. *Structure* **7**, 1167–1180.
- Avery S. V. and Tobin J. M. (1992) Mechanisms of strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3883–3889.
- Ayalon A., Bar-Matthews M. and Kaufman A. (1999) Petrography, strontium, barium and uranium concentrations, and strontium and uranium isotope ratios in speleothems as palaeoclimatic proxies: Soreq Cave, Israel. *The Holocene* **9**, 715–722.
- Badger M. R. and Andrews T. J. (1982) Photosynthesis and Inorganic Carbon Usage by the Marine Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* **70**, 517–523.
- Badger M. R., Bassett M. and Comins H. N. (1985) A Model for HCO_3^- Accumulation and Photosynthesis in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp Theoretical Predictions and Experimental Observations. *Plant Physiol.* **77**, 465–471.
- Badger M. R. and Price G. D. (2003) CO_2 concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* **54**, 609–622.
- Badger M. R., Price G. D., Long B. M. and Woodger F. J. (2006) The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO_2 concentrating mechanism. *J. Exp. Bot.* **57**, 249–265.
- Barrán-Berdón A. L., Rodea-Palomares I., Leganés F. and Fernández-Piñas F. (2011) Free Ca^{2+} as an early intracellular biomarker of exposure of cyanobacteria to environmental pollution. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 1015–1029.
- Belkin S. and Boussiba S. (1991) High internal pH conveys ammonia resistance in *spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* **38**, 167–169.
- Bentov S., Weil S., Glazer L., Sagi A. and Berman A. (2010) Stabilization of amorphous calcium carbonate by phosphate rich organic matrix proteins and by single phosphoamino acids. *J. Struct. Biol.* **171**, 207–215.
- Benzerara K., Skouri-Panet F., Li J., Féraud C., Gugger M., Laurent T., Couradeau E., Ragon M., Cosmidis J., Menguy N., Margaret-Oliver I., Tavera R., López-García P. and

- Moreira D. (2014) Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 10933–10938.
- Bihler I., Charles P. and Sawh P. C. (1986) Effects of strontium on calcium-dependent hexose transport in muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**, 176–179.
- Bosak T., Liang B., Wu T.-D., Templer S. P., Evans A., Vali H., Guerquin-Kern J.-L., Klepac-Ceraj V., Sim M. S. and Mui J. (2012) Cyanobacterial diversity and activity in modern conical microbialites. *Geobiology* **10**, 384–401.
- Bramlette M. N. (1958) Significance of Coccolithophorids in Calcium-Carbonate Deposition. *Geol. Soc. Am. Bull.* **69**, 121–126.
- Brook A. J., Grime G. W. and Watt F. (1988) A study of barium accumulation in desmids using the Oxford scanning proton microprobe (SPM). *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **30**, 372–377.
- Brown S. D., Martin M., Deshpande S., Seal S., Huang K., Alm E., Yang Y., Wu L., Yan T., Liu X., Arkin A., Chourey K., Zhou J. and Thompson D. K. (2006) Cellular Response of *Shewanella oneidensis* to Strontium Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 890–900.
- Bundeleva I. A., Shirokova L. S., Pokrovsky O. S., Bénézeth P., Ménez B., Gérard E. and Balor S. (2014) Experimental modeling of calcium carbonate precipitation by cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Chem. Geol.* **374–375**, 44–60.
- Campbell A. K. (2014) *Intracellular Calcium*., John Wiley & Sons.
- Chan C. S., Fakra S. C., Emerson D., Fleming E. J. and Edwards K. J. (2011) Lithotrophic iron-oxidizing bacteria produce organic stalks to control mineral growth: implications for biosignature formation. *ISME J.* **5**, 717–727.
- Chen T.-H., Huang T.-C. and Chow T.-J. (1988) Calcium requirement in nitrogen fixation in the cyanobacterium *Synechococcus* RF-1. *Planta* **173**, 253–256.
- Couradeau E., Benzerara K., Gérard E., Estève I., Moreira D., Tavera R. and López-García P. (2013) Cyanobacterial calcification in modern microbialites at the submicrometer scale. *Biogeosciences* **10**, 5255–5266.
- Couradeau E., Benzerara K., Gerard E., Moreira D., Bernard S., Brown G. E. and Lopez-Garcia P. (2012) An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science* **336**, 459–462.
- Dabbagh R., Ghafourian H., Baghvand A., Nabi G. R., Riahi H. and Ahmadi Faghih M. A. (2007) Bioaccumulation and biosorption of stable strontium and ⁹⁰Sr by *Oscillatoria homogenea* cyanobacterium. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **272**, 53–59.
- Davies C. W., Association I. and others (1962) *Butterworths*., London.
- Debus R. J. (1992) The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1102**, 269–352.

- Delwiche C. F. and Palmer J. D. (1997) The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In *Origins of Algae and their Plastids* (ed. D. D. Bhattacharya). Plant Systematics and Evolution. Springer Vienna. pp. 53–86.
- Dietzel M., Gussone N. and Eisenhauer A. (2004) Co-precipitation of Sr^{2+} and Ba^{2+} with aragonite by membrane diffusion of CO_2 between 10 and 50 °C. *Chem. Geol.* **203**, 139–151.
- Docampo R. and Moreno S. N. J. (2001) The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* **114**, 151–159.
- Docampo R., Scott D. A., Vercesi A. E. and Moreno S. N. J. (1995) Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **310**, 1005–1012.
- Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P. and Moreno S. N. J. (2005) Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 251–261.
- Dominguez D. C. (2004) Calcium signalling in bacteria. *Mol. Microbiol.* **54**, 291–297.
- Dymond J., Suess E. and Lyle M. (1992) Barium in Deep-Sea Sediment: A Geochemical Proxy for Paleoproductivity. *Paleoceanography* **7**, 163–181.
- Falke J. J., Snyder E. E., Thatcher K. C. and Voertler C. S. (1991) Quantitating and engineering the ion specificity of an EF-hand-like calcium binding site. *Biochemistry (Mosc.)* **30**, 8690–8697.
- Fayek S. A. and El-Sayed S. M. (2003) Characterization of short-range order in an amorphous Cd–Se–Te system by wide angle X-ray scattering(WAXS). *NDT E Int.* **36**, 619–623.
- Fernandez-Martinez A., Kalkan B., Clark S. M. and Waychunas G. A. (2013) Pressure-Induced Polyamorphism and Formation of “Aragonitic” Amorphous Calcium Carbonate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 8354–8357.
- Fuhrman J. (2003) Genome sequences from the sea. *Nature* **424**, 1001–1002.
- Fujita Y., Redden G. D., Ingram J. C., Cortez M. M., Ferris F. G. and Smith R. W. (2004) Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis1. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 3261–3270.
- Fukuda S., Iwamoto K., Atsumi M., Yokoyama A., Nakayama T., Ishida K., Inouye I. and Shiraiwa Y. (2014) Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy. *J. Plant Res.* **127**, 79–89.
- Gangola P. and Rosen B. P. (1987) Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 12570–12574.
- Gebauer D., Gunawidjaja P. N., Ko J. Y. P., Bacsik Z., Aziz B., Liu L., Hu Y., Bergström L., Tai C.-W., Sham T.-K., Edén M. and Hedin N. (2010) Proto-Calcite and Proto-Vaterite in Amorphous Calcium Carbonates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 8889–8891.

- Gérard E., Ménez B., Couradeau E., Moreira D., Benzerara K., Tavera R. and López-García P. (2013) Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico). *ISME J.* **7**, 1997–2009.
- Gourier D., Binet L., Sczypczak A., Derenne S. and Robert F. (2004) Search for EPR markers of the history and origin of the insoluble organic matter in extraterrestrial and terrestrial rocks. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **60**, 1349–1357.
- Griko Y. V. (1999) Energetics of Ca^{2+} –EDTA interactions: calorimetric study. *Biophys. Chem.* **79**, 117–127.
- Gustafsson J. P. (2013) Visual MINTEQ | Visual MINTEQ – a free equilibrium speciation model.
- Hammes F. and Verstraete W. (2002) Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **1**, 3–7.
- Han Z., Yan H., Zhao H., Zhou S., Han M., Meng X., Zhang Y., Zhao Y., Sun B., Yao C., Wang Y., Wang C., Li F., Tian C. and Xu L. (2014) Bio-precipitation of Calcite with Preferential Orientation Induced by *Synechocystis* sp. PCC6803. *Geomicrobiol. J.* **31**, 884–899.
- Hegler F., Schmidt C., Schwarz H. and Kappler A. (2010) Does a low-pH microenvironment around phototrophic FeII-oxidizing bacteria prevent cell encrustation by FeIII minerals? *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**, 592–600.
- Henikoff S., Greene E. A., Pietrokovski S., Bork P., Attwood T. K. and Hood L. (1997) Gene Families: The Taxonomy of Protein Paralogues and Chimeras. *Science* **278**, 609–614.
- Jansson C. and Northen T. (2010) Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 365–371.
- Jiang H.-B., Cheng H.-M., Gao K.-S. and Qiu B.-S. (2013) Inactivation of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Exchanger in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Promotes Cyanobacterial Calcification by Upregulating CO_2 -Concentrating Mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4048–4055.
- Kamennaya N. A., Ajo-Franklin C. M., Northen T. and Jansson C. (2012) Cyanobacteria as Biocatalysts for Carbonate Mineralization. *Minerals* **2**, 338–364.
- Kaplan A. and Reinhold L. (1999) CO_2 Concentrating Mechanisms in Photosynthetic Microorganisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 539–570.
- Kellermeier M., Picker A., Kempter A., Cölfen H. and Gebauer D. (2014) A Straightforward Treatment of Activity in Aqueous CaCO_3 Solutions and the Consequences for Nucleation Theory. *Adv. Mater.* **26**, 752–757.
- Kirichok Y., Krapivinsky G. and Clapham D. E. (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360–364.

- Klein C., Beukes N. J. and Schopf J. W. (1987) Filamentous microfossils in the early proterozoic transvaal supergroup: their morphology, significance, and paleoenvironmental setting. *Precambrian Res.* **36**, 81–94.
- Krejci M. R., Finney L., Vogt S. and Joester D. (2011) Selective Sequestration of Strontium in Desmid Green Algae by Biogenic Co-precipitation with Barite. *ChemSusChem* **4**, 470–473.
- Krejci M. R., Wasserman B., Finney L., McNulty I., Legnini D., Vogt S. and Joester D. (2011) Selectivity in biomineralization of barium and strontium. *J. Struct. Biol.* **176**, 192–202.
- Kunioka D., Shirai K., Takahata N., Sano Y., Toyofuku T. and Ujiie Y. (2006) Microdistribution of Mg/Ca, Sr/Ca, and Ba/Ca ratios in Pulleniatina obliquiloculata test by using a NanoSIMS: Implication for the vital effect mechanism. *Geochem. Geophys. Geosystems* **7**, Q12P20.
- Langer G., Gussone N., Nehrke G., Riebesell U., Eisenhauer A., Kuhnert H., Rost B., Trimborn S. and Thoms S. (2006) Coccolith strontium to calcium ratios in Emiliana huxleyi: The dependence on seawater strontium and calcium concentrations. *Limnol. Oceanogr.* **51**, 310–320.
- Langer G., Nehrke G., Thoms S. and Stoll H. (2009) Barium partitioning in coccoliths of Emiliana huxleyi. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 2899–2906.
- Lauchnor E. G., Schultz L. N., Bugni S., Mitchell A. C., Cunningham A. B. and Gerlach R. (2013) Bacterially Induced Calcium Carbonate Precipitation and Strontium Coprecipitation in a Porous Media Flow System. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 1557–1564.
- Lee B. D., Apel W. A. and Walton M. R. (2006) Calcium carbonate formation by Synechococcus sp. strain PCC 8806 and Synechococcus sp. strain PCC 8807. *Bioresour. Technol.* **97**, 2427–2434.
- Lee B. D., Apel W. A. and Walton M. R. (2004) Screening of Cyanobacterial Species for Calcification. *Biotechnol. Prog.* **20**, 1345–1351.
- Lee S. Y., Jung K.-H., Lee J. E., Lee K. A., Lee S.-H., Lee J. Y., Lee J. K., Jeong J. T. and Lee S.-Y. (2014) Photosynthetic biomineralization of radioactive Sr via microalgal CO₂ absorption. *Bioresour. Technol.* **172**, 449–452.
- Li J., Bernard S., Benzerara K., Beyssac O., Allard T., Cosmidis J. and Moussou J. (2014) Impact of biomineralization on the preservation of microorganisms during fossilization: An experimental perspective. *Earth Planet. Sci. Lett.* **400**, 113–122.
- Liu M., Dong F., Kang W., Sun S., Wei H., Zhang W., Nie X., Guo Y., Huang T. and Liu Y. (2014) Biosorption of Strontium from Simulated Nuclear Wastewater by Scenedesmus spinosus under Culture Conditions: Adsorption and Bioaccumulation Processes and Models. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **11**, 6099–6118.
- Lowenstam H. (1961) Mineralogy, O-18/O-16 Ratios, and Strontium and Magnesium Contents of Recent and Fossil Brachiopods and Their Bearing on the History of the Oceans. *J. Geol.* **69**, 241–260.

- Lowenstam H. A. (1981) Minerals Formed by Organisms. *Science* **211**, 1126–1131.
- Malassez L. (1873) *De la Numération des globules rouges du sang. I. Des méthodes de numération. II. De la richesse du sang en globules rouges dans les différentes parties de l'arbre circulatoire. Par L. Malassez, A. Delahaye* (Paris).
- Manos M. J., Ding N. and Kanatzidis M. G. (2008) Layered metal sulfides: Exceptionally selective agents for radioactive strontium removal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3696–3699.
- Marcilla A., Gómez-Siurana A., Gomis C., Chápuli E., Catalá M. C. and Valdés F. J. (2009) Characterization of microalgal species through TGA/FTIR analysis: Application to nanochloropsis sp. *Thermochim. Acta* **484**, 41–47.
- Meibom A., Cuif J.-P., Houlbreque F., Mostefaoui S., Dauphin Y., Meibom K. L. and Dunbar R. (2008) Compositional variations at ultra-structure length scales in coral skeleton. *Geochim. Cosmochim. Acta* **72**, 1555–1569.
- Miller A. G. and Colman B. (1980) Evidence for HCO₃⁻ Transport by the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Coccochloris penicystis*. *Plant Physiol.* **65**, 397–402.
- Millero F. J., Milne P. J. and Thurmond V. L. (1984) The solubility of calcite, strontianite and witherite in NaCl solutions at 25°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* **48**, 1141–1143.
- Miot J., Benzerara K., Morin G., Kappler A., Bernard S., Obst M., Férard C., Skouri-Panet F., Guigner J.-M., Posth N., Galvez M., Brown Jr. G. E. and Guyot F. (2009) Iron biomineralization by anaerobic neutrophilic iron-oxidizing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 696–711.
- Moore J., Stanitski C. and Jurs P. (2009) *Principles of chemistry: the molecular science.*, Cengage Learning.
- Nehrke G., Reichart G. J., Van Cappellen P., Meile C. and Bijma J. (2007) Dependence of calcite growth rate and Sr partitioning on solution stoichiometry: Non-Kossel crystal growth. *Geochim. Cosmochim. Acta* **71**, 2240–2249.
- Norris V., Grant S., Freestone P., Canvin J., Sheikh F. N., Toth I., Trinei M., Modha K. and Norman R. I. (1996) Calcium signalling in bacteria. *J. Bacteriol.* **178**, 3677.
- Nudelman F., Sonmezler E., Bomans P. H. H., de With G. and Sommerdijk N. A. J. M. (2010) Stabilization of amorphous calcium carbonate by controlling its particle size. *Nanoscale* **2**, 2436.
- Ozaki Y., Yatomi Y. and Kume S. (1992) Evaluation of platelet calcium ion mobilization by the use of various divalent ions. *Cell Calcium* **13**, 19–27.
- Pandey P. K., Singh B. B., Mishra R. and Bisen P. S. (1996) Ca²⁺ uptake and its regulation in the cyanobacterium Nostoc MAC. *Curr. Microbiol.* **32**, 332–335.
- Partensky F., Hess W. R. and Vault D. (1999) Prochlorococcus, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 106–127.

- Pohl P. and Schimmack W. (2006) Adsorption of Radionuclides (^{134}Cs , ^{85}Sr , ^{226}Ra , ^{241}Am) by Extracted Biomasses of Cyanobacteria (Nostoc Carneum, N. Insulare, Oscillatoria Geminata and Spirulina Laxis-Sima) and Phaeophyceae (Laminaria Digitata and L. Japonica; Waste Products from Alginate Production) at Different pH. *J. Appl. Phycol.* **18**, 135–143.
- Pokrovsky O. S., Martinez R. E., Golubev S. V., Kompantseva E. I. and Shirokova L. S. (2008) Adsorption of metals and protons on Gloeocapsa sp. cyanobacteria: A surface speciation approach. *Appl. Geochem.* **23**, 2574–2588.
- Politi Y., Metzler R. A., Abrecht M., Gilbert B., Wilt F. H., Sagi I., Addadi L., Weiner S. and Gilbert P. (2008) Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17362–17366.
- Price G. D., Coleman J. R. and Badger M. R. (1992) Association of Carbonic Anhydrase Activity with Carboxysomes Isolated from the Cyanobacterium Synechococcus PCC7942. *Plant Physiol.* **100**, 784–793.
- Price G. D., Maeda S., Omata T. and Badger M. R. (2002) Modes of active inorganic carbon uptake in the cyanobacterium, Synechococcus sp. PCC 7942. *Funct. Plant Biol.* **29**, 131–149.
- Radha A. V., Fernandez-Martinez A., Hu Y., Jun Y.-S., Waychunas G. A. and Navrotsky A. (2012) Energetic and structural studies of amorphous $\text{Ca}_{1-x}\text{Mg}_x\text{CO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($0 \leq x \leq 1$). *Geochim. Cosmochim. Acta* **90**, 83–95.
- Ragon M., Benzerara K., Moreira D., Tavera R. and López-García P. (2014) 16S rDNA-based analysis reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. *Front. Microbiol.* **5**.
- Reusch R. N., Huang R. and Bramble L. L. (1995) Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca^{2+} channels in the plasma membranes of Escherichia coli. *Biophys. J.* **69**, 754–766.
- Riding R. (2006) Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic? Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiology* **4**, 299–316.
- Rimstidt J. D., Balog A. and Webb J. (1998) Distribution of trace elements between carbonate minerals and aqueous solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **62**, 1851–1863.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M. and Stanier R. Y. (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1–61.
- Rosen B. P. (1987) Bacterial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **906**, 101–110.
- Schopf J. W. (2000) Solution to Darwin's dilemma: Discovery of the missing Precambrian record of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6947–6953.
- Schopf J. W., Kudryavtsev A. B., Czaja A. D. and Tripathi A. B. (2007) Evidence of Archean life: Stromatolites and microfossils. *Precambrian Res.* **158**, 141–155.

- Schumaker K. S. and Sze H. (1986) Calcium transport into the vacuole of oat roots. Characterization of H⁺/Ca²⁺ exchange activity. *J. Biol. Chem.* **261**, 12172–12178.
- Seewald J. S. (2001) Aqueous geochemistry of low molecular weight hydrocarbons at elevated temperatures and pressures: constraints from mineral buffered laboratory experiments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 1641–1664.
- Seufferheld M., Vieira M. C. F., Ruiz F. A., Rodrigues C. O., Moreno S. N. J. and Docampo R. (2003) Identification of Organelles in Bacteria Similar to Acidocalcisomes of Unicellular Eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **278**, 29971–29978.
- Shannon R. D. (1976) Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr. Sect. A* **32**, 751–767.
- Siong K. and Asaeda T. (2009) Calcite encrustation in macro-algae Chara and its implication to the formation of carbonate-bound cadmium. *J. Hazard. Mater.* **167**, 1237–1241.
- Smith R. J. (1995) Calcium and bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **37**, 83–133.
- Stephens C. J., Ladden S. F., Meldrum F. C. and Christenson H. K. (2010) Amorphous Calcium Carbonate is Stabilized in Confinement. *Adv. Funct. Mater.* **20**, 2108–2115.
- Sternberg E., Tang D., Ho T.-Y., Jeandel C. and Morel F. M. M. (2005) Barium uptake and adsorption in diatoms. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**, 2745–2752.
- Takahashi S., Aizawa K., Nakamura S., Nakayama K., Fujisaki S., Watanabe S. and Satoh H. (2015) Accumulation of alkaline earth metals by the green macroalga *Bryopsis maxima*. *BioMetals* **28**, 391–400.
- Tesoriero A. J. and Pankow J. F. (1996) Solid solution partitioning of Sr²⁺, Ba²⁺, and Cd²⁺ to calcite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 1053–1063.
- Thompson J. B. and Ferris F. G. (1990) Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite, and magnesite from natural alkaline lake water. *Geology* **18**, 995–998.
- Tomitani A., Knoll A. H., Cavanaugh C. M. and Ohno T. (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5442–5447.
- Torrecilla I., Leganés F., Bonilla I. and Fernández-Piñas F. (2000) Use of Recombinant Aequorin to Study Calcium Homeostasis and Monitor Calcium Transients in Response to Heat and Cold Shock in Cyanobacteria. *Plant Physiol.* **123**, 161–176.
- Usachev Y. M. and Mironov S. L. (1989) Effects of strontium and barium ions on calcium bindings and transport in nerve cells. *Neurophysiology* **21**, 587–591.
- Vakulovsky S. M., Nikitin A. I., Chumichev V. B., Katrich I. Y., Voitsekhovich O. A., Medinets V. I., Pisarev V. V., Bovkum L. A. and Khersonsky E. S. (1994) Cesium-137 and strontium-90 contamination of water bodies in the areas affected by releases from the chernobyl nuclear power plant accident: an overview. *J. Environ. Radioact.* **23**, 103–122.

- Vercesi A. E. and Docampo R. (1996) Sodium-proton exchange stimulates Ca^{2+} release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **315**, 265–270.
- Vrettos J. S., Stone D. A. and Brudvig G. W. (2001) Quantifying the Ion Selectivity of the Ca^{2+} Site in Photosystem II: Evidence for Direct Involvement of Ca^{2+} in O_2 Formation[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 7937–7945.
- Waditee R., Hossain G. S., Tanaka Y., Nakamura T., Shikata M., Takano J., Takabe T. and Takabe T. (2004) Isolation and Functional Characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporters from Cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* **279**, 4330–4338.
- Whitton B. A. (2012) *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time.*, Springer Science & Business Media.
- Zimmermann M., Escrig S., Hübschmann T., Kirf M. K., Brand A., Inglis R. F., Musat N., Müller S., Meibom A., Ackermann M. and Schreiber F. (2015) Phenotypic heterogeneity in metabolic traits among single cells of a rare bacterial species in its natural environment quantified with a combination of flow cell sorting and NanoSIMS. *Front. Microbiol.* **6**.

Annexe 1 - Suivi du milieu de culture seul

Le but de cette expérience est de contrôler l'évolution de divers paramètres du milieu de culture des cyanobactéries. Ce premier test à été fait sur le milieu seul : 750 mL de BG-11 (cf. Matériel et Méthodes, § 1.3) sont placés dans un bocal (Le Parfait) et agité à 100 rpm, à 25 °C puis la température est augmentée à 30 °C après 60-70 h. Le bouchon est perforé pour y placer des sondes de température, de pH, de pO₂, de conductivité et de calcium ; le milieu est en échange avec l'atmosphère. Pour toutes les sondes, une mesure est faite toutes les 10 min. La pO₂ est constante vers 100 % avec un décrochage jusqu'à 80 % lors du changement de température. La conductivité est constante vers 2300 µS/cm (une dérive est visible). La concentration en calcium mesurée varie entre 5 et 10 mM (0,250 mM sont introduit), il y a donc des interférences sur cette mesure.

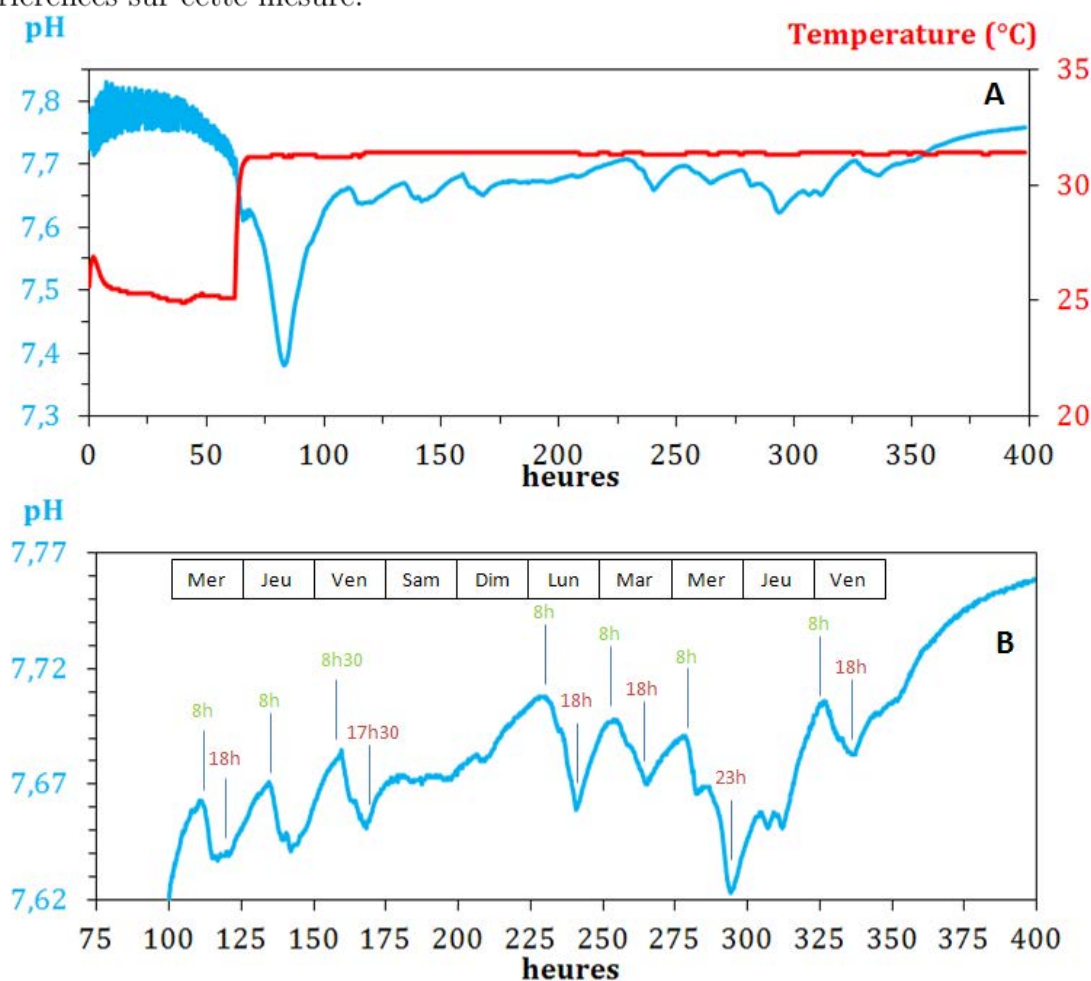


Figure Ax.1: Suivi du milieu BG-11 stérile. (A) Évolution du pH pendant 400 h, la température est réglée à 25 °C au début puis à 30 °C après 60-70 h. (B) Zoom fait sur le pH entre 100 et 400 h ; le pH varie avec l'heure de la journée et les jours ouvrables.

La Figure Ax.1 présente les changements de pH mesurés dans la solution. On peut voir que le pH peut varier d'environ 0,1 unité. Ces variations sont périodiques et semblent correspondre avec l'activité du laboratoire, le pH varie avec la atmosphère qui varie avec la présence du personnel.

Annexe 2 - Incorporation du calcium par la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312

La souche PCC 6312 forme des carbonates intracellulaires qui sont localisés au niveau des pôles de la cellule.

Trois cultures de cette souche sont incubées dans du milieu BG-11 à 30 °C sous lumière continue. Les relevés de pH, de DO et de concentration en calcium dans le milieu sont présentés en Figure Ax.1. On remarque que le pH augmente rapidement avant d'atteindre un plateau d'environ 10 après 150 h d'incubation. La phase de diminution de la concentration en calcium s'étend de $t = 75$ h à $t = 400$ h. La DO augmente sans discontinuité apparente jusqu'à la fin du suivi des cultures (750 h).

Les courbes de croissance représentées en logarithme de la DO sont en Figure Ax.2. On peut voir qu'il n'y a pas de phase de latence dans ces cultures. Il y a une première phase de croissance jusqu'à 150 h environ avec un temps de génération de 50 h en moyenne ; le pH augmente durant cette phase. Cette phase est suivie d'une deuxième phase de croissance plus lente (temps de génération de 138 h en moyenne) qui s'étend entre 400 et 500 h ; le pH est au plateau (environ 10) durant cette phase. Ensuite les cellules se multiplient encore plus lentement. La fin de la deuxième phase de croissance à lieu 50 à 100 h après la fin de la diminution de la concentration en calcium.

La Figure Ax.4 montre les observations en STEM d'une culture de *Synechococcus* sp. PCC 6312 cultivée dans du BG-11. On voit là encore que les zones des cellules les plus riches en calcium sont les carbonates.

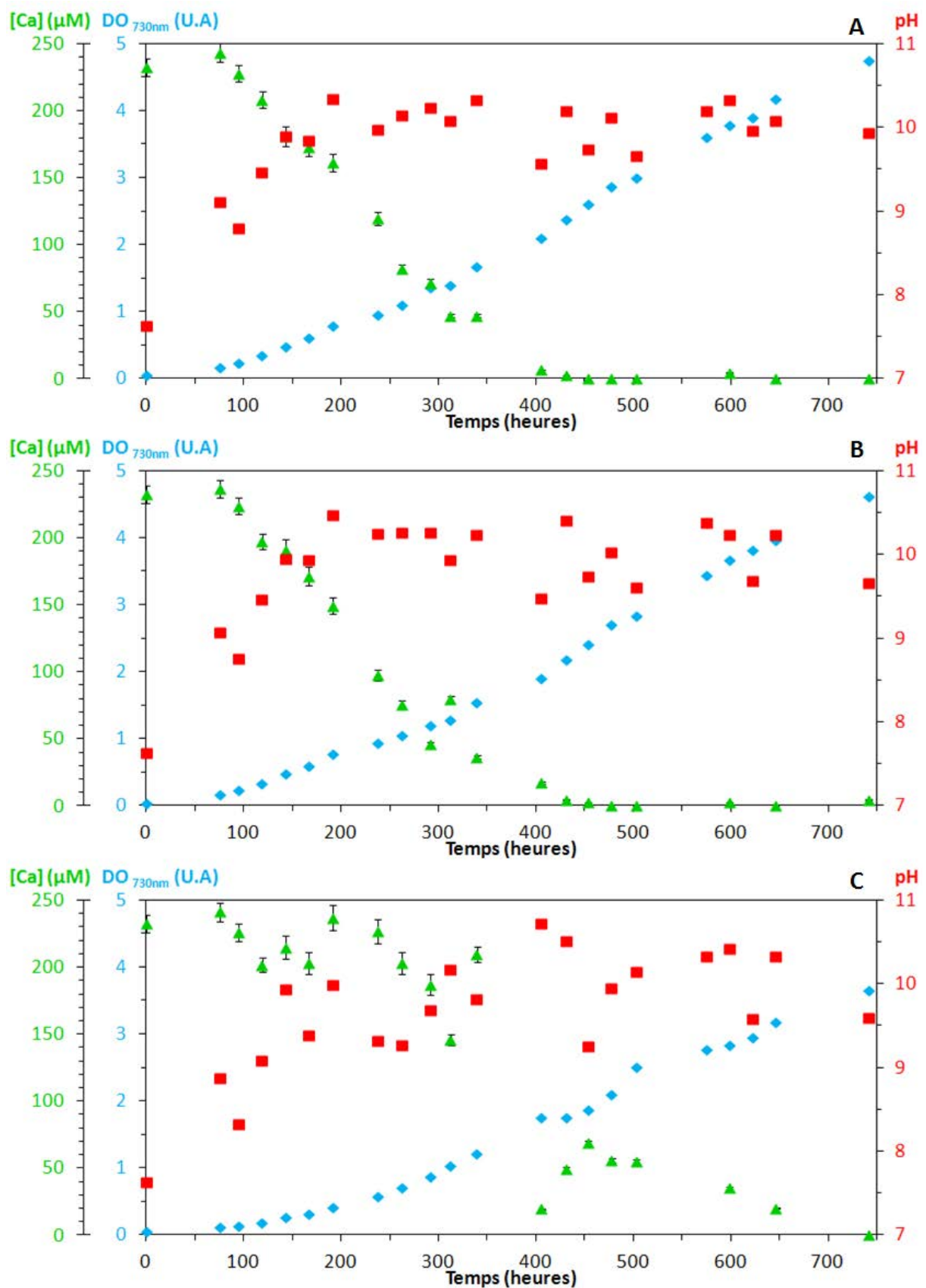


Figure Ax.1 : Culture de *Synechococcus* sp. PCC 6312 dans un milieu BG-11 sous lumière continue à 30 °C. Suivi de la DO, du pH et de la concentration en calcium mesurée par colorimétrie. Les graphiques A, B et C correspondent à trois réplicats.

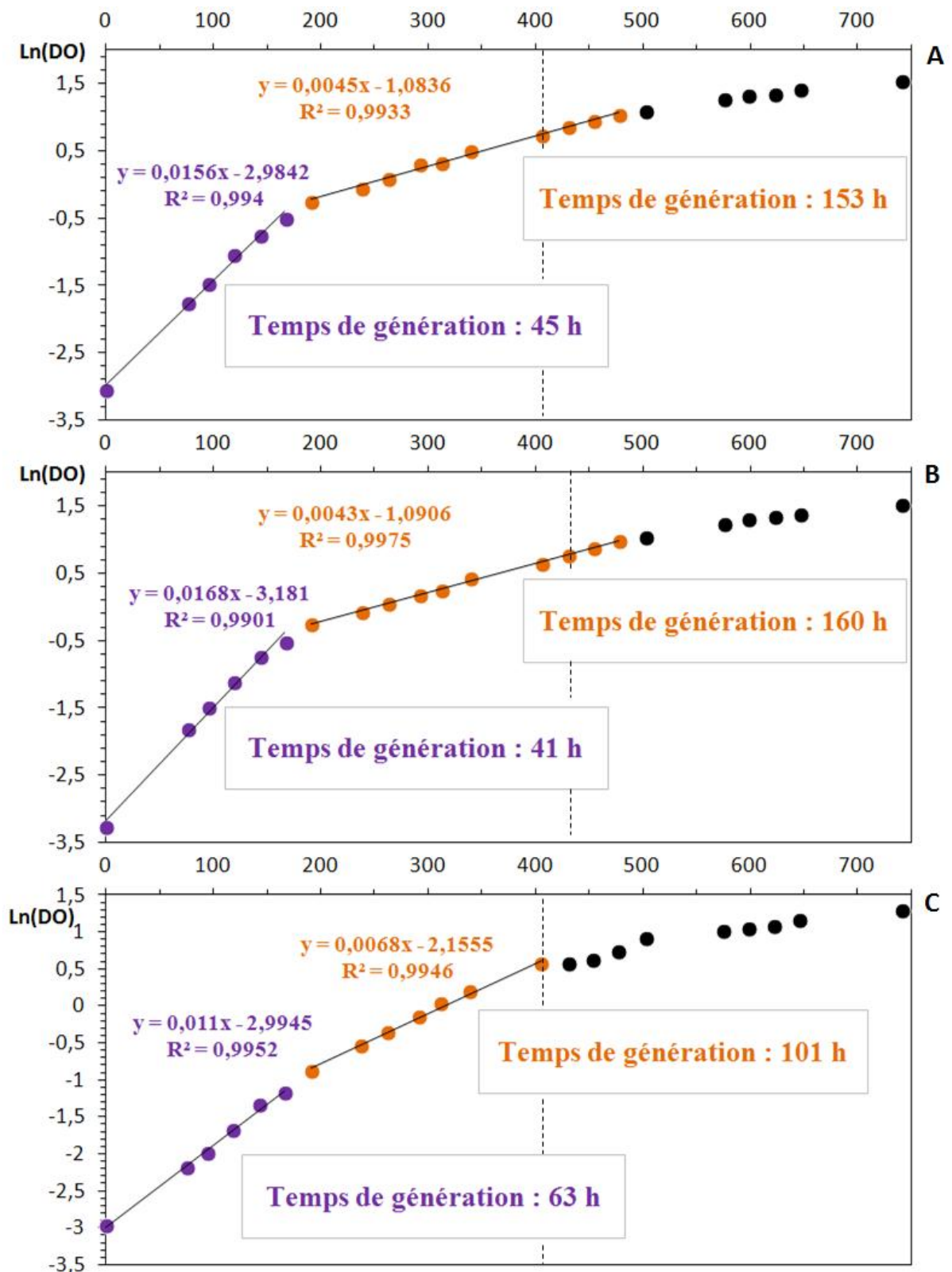


Figure Ax.2 : Culture de *Synechococcus* sp. PCC 6312 dans le milieu BG-11. Logarithme népérien de la DO durant la croissance. Les graphiques A, B et C correspondent aux trois répliqués. Les lignes en tirets représentent le premier point pour le lequel la concentration en calcium est la plus basse.

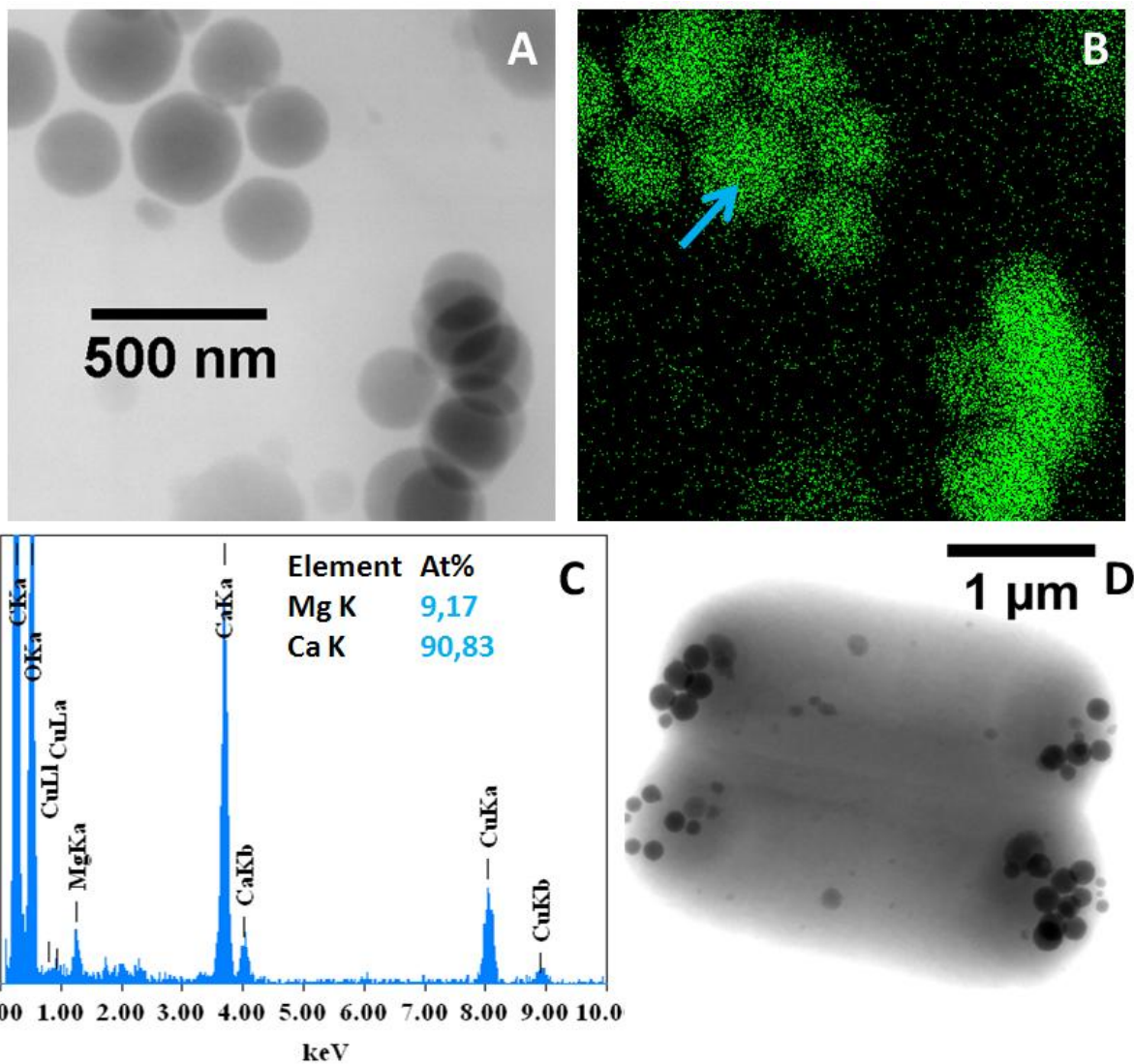


Figure Ax.4 : Culture de *Synechococcus* sp. PCC 6312. (A) Image STEM en mode BF de carbonates intracellulaires. (B) Cartographie EDXS du calcium (vert) d'inclusions intracellulaires. (C) Spectres EDXS d'un carbonate de calcium. (D) Image STEM-BF de deux cellules contenant des carbonates de calcium.

Biominéralisation par des cyanobactéries : du modèle aux cellules

Résumé :

Cette thèse vise à avancer dans la compréhension de la formation récemment découverte de carbonates amorphes intracellulaires par des cyanobactéries.

Des synthèses abiotiques ont permis de produire des carbonates similaires aux inclusions intracellulaires en termes de morphologie, structure et composition chimique.

Ceci a permis notamment de discuter les conditions chimiques présentes dans le milieu intracellulaire de ces bactéries, qui semblent incompatibles avec les connaissances actuelles de l'intérieur des cyanobactéries.

Plusieurs souches de cyanobactéries formant ou non des carbonates intracellulaires ont été cultivées en laboratoire. Des études de chimie des solutions sur le milieu extracellulaire ont montré que la précipitation intracellulaire est un processus actif pour la cellule, c'est-à-dire nécessitant de l'énergie. De plus, les cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires imposent de faibles concentrations en calcium dans leur milieu de vie.

Le suivi de la formation de carbonates intracellulaires dans des milieux contrôlés a aussi permis de démontrer qu'une espèce formait spécifiquement des carbonates de baryum et de strontium grâce à une affinité pour le baryum supérieure à celle pour le strontium, elle-même supérieure à celle pour le calcium. Ceci ouvre des perspectives intéressantes pour la dépollution et questionne l'utilisation des rapports Sr/Ca comme proxy des paléo-environnements.

Mots clés : [Biominéralisation, cyanobactéries, carbonate de calcium amorphe, séquestration du strontium, séquestration du baryum]

Biomineralization by Cyanobacteria: From Model to Cells

Abstract:

In this thesis we study the recently discovered formation of intracellular amorphous carbonates by cyanobacteria.

Abiotic syntheses produced carbonates with a morphology, structure and composition similar as intracellular inclusions. The intracellular chemical conditions in the cyanobacteria can be discussed; they seem inconsistent with our current knowledge about cyanobacteria.

Several cyanobacterial strains, forming intracellular carbonates or not, were cultured in the laboratory. Analyses of the chemical composition of extracellular solutions showed that intracellular precipitation is an active process, i.e., it needs energy. Also, cyanobacteria forming intracellular calcium carbonates imposed low concentrations in calcium in their living environment.

Monitoring the formation of intracellular carbonates in controlled environments also demonstrated that one species formed carbonates of barium and strontium owing to an affinity for barium higher than for strontium and higher for strontium than calcium. This feature opens interesting perspectives on bioremediation and questions the use of Sr/Ca ratios as a proxy for paleo-environments.

Keywords: [Biomineralization, cyanobacteria, amorphous calcium carbonate, strontium sequestration, barium sequestration]